

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

COMPLEXES EN FORME SOLIDE DES HUILES OMEGA-3 AVEC DU
CARBOXYMÉTHYL AMIDON: POUDRES ET COMPRIMÉS MONOLITHIQUES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

NASSIMA LARBI

MARS 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et de m'avoir accordé un soutien sans faille durant mes études en maîtrise. Je lui exprime également ma gratitude pour ses conseils avisés et généreux.

Je remercie aussi, et de manière particulière, le Dr Canh Tien Le pour sa disponibilité, son soutien indéfectible et sa gentillesse. Il a su m'apporter l'aide nécessaire au moment où j'en avais le plus besoin.

Je ne puis oublier de remercier le professeur Huu Van Tra pour sa gentillesse et l'intérêt qu'il a accordé à mon travail à des moments décisifs.

Je remercie Dr Pompilia Ispas-Szabo pour son aide et pour ses conseils scientifiques.

Je désire remercier mes collègues de laboratoire pour leur soutien et les moments partagés ensemble.

Mes pensées vont à mes parents auxquels je tiens à exprimer toute ma gratitude pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté, de manière constante, durant tout le développement de ma recherche. Je n'oublie pas mes deux sœurs qui m'ont été d'un réconfort à toute épreuve.

Je remercie de tout cœur mon conjoint Assil qui m'a soutenue au fil des jours. Ma reconnaissance va également à sa famille Houfani et en particulier à ma belle-mère Ghania.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTES DES ABRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I	
L'HUILE OMÉGA-3, RÔLE EN NUTRITION.....	1
1.1 Oméga-3— Structure, source et biosynthèse	1
1.2 Fonction des oméga-3	5
1.2.1 Rôle structural.....	7
1.2.2 Précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs	8
1.2.3 Rôle modulateur de la transcription génique	8
1.2.4 Effet sur le cerveau	12
1.2.3 Effet cardioprotecteur.....	13
1.3 Recommandations pour l'apport en AGPI n-3	14
CHAPITRE II	
L'AMIDON ET LE CARBOXYMÉTHYL AMIDON COMME EXCIPIENTS PHARMACEUTIQUES.....	16
2.1 L'amidon—structure et propriétés.....	16
2.1.1 Structure granulaire de l'amidon	19
2.1.2 Transformation hydrothermique.....	24
2.1.2.1 La solubilité.....	24
2.1.2.2 La gélatinisation.....	25
2.1.2.3 La gélification	26
2.1.2.4 La rétrogradation	26
2.1.3 Formation des complexes amylose-lipides.....	28
2.1.4 Le carboxyméthyl amidon	29

CHAPITRE III	
LA GÉLATINE ET L'ENCAPSULATION DANS LE DOMAINE	
PHARMACEUTIQUE.....	33
3.1 La gélatine.....	33
3.1.1 Origine de la gélatine.....	33
3.1.2 Structure de la gélatine.....	35
3.1.3 Propriétés physico-chimiques de la gélatine	36
1.2 3.1.3.1 La gélatine en solution	37
3.1.3.2 Propriétés de surface.....	38
3.1.3.3 Propriétés filmogène.....	38
3.2 L'encapsulation.....	41
3.2.1 Techniques d'encapsulation	42
3.2.1.1 Liposomes et les molécules tensioactives	42
3.2.1.2 L'émulsion	44
3.2.1.3 Nébulisation ou «spray drying»	46
CHAPITRE IV	
PRÉSENTATION DU PROJET	47
SECTION EXPÉRIMENTALE.....	52
CHAPITRE V	
COMPLEXES EN FORME SOLIDE DES HUILES OMEGA-3 AVEC	
DU CARBOXYMÉTHYL AMIDON : POUDRES ET COMPRIMÉS	
MONOLITHIQUES.....	53
CHAPITRE VI	
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure

1.1 Structure générale des acides gras.....	3
1.2 Structure des acides gras de la série n-3	4
1.3 Voie de biosynthèse des oméga-3	6
1.3 1.4 Schéma de la synthèse des eicosanoïdes à partir des AGPI $\omega 3$	10
1.5 Représentation schématique des effets des AGPI $\omega 3$	11
2.1 Structure de l'amylose	17
2.2 Structure de l'amylopectine	18
2.3 Présentation schématique de la structure cristalline du grain d'amidon	20
2.4 Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe A	22
2.5 Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe B	22
2.6 Géométrie moléculaire de l'amylose	23
2.7 Représentation schématique des changements structuraux.....	25
2.8 Représentation schématique de la recristallisation	27
2.9 Représentation schématique de la synthèse du Carboxyméthyl amidon	30
2.10 Présentation schématique d'un complexe d'inclusion.....	32
3.1 Produits de dégradation du collagène	36
3.2 Structure schématisée d'un liposome.....	42
3.3 Différentes architecteurs d'amphiphiles synthétiques	43
3.4 Technique d'émulsion du principe actif	44
4.1 Présentation schématique des différentes étapes du projet de maîtrise	51
5.1.1 <i>Iodine stained sample</i>	67
5.1.2 <i>FT-IR spectra of native starch, CMS, CMS-$\omega 3$/G and CMS+$\omega 3$-G</i>	68
5.1.3 <i>XRD patterns</i>	70
5.1.4 <i>Release profile of $\omega 3$</i>	71

5.1.5 Susceptibility of tablets to hydrolysis with α -amylase	72
5.1.6 Light stability of $\omega 3$	73
5.1.7 Hypothetical structure of CMS- $\omega 3$ /G	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAL	Acide α -linolénique
ADH	Acide docosahexaénoïque
AEP	Acide éicosapentaénoïque
AG	Acide gras
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGPI-LC	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
COX	Cyclo-Oxygénase
CMA	Carboxyméthyl amidon
DP	Degré de polymérisation
DART	<i>Diet and Reinfraction Trial</i>
DRX	Diffraction des rayons X
DS	Degré de substitution
EE	Éthyl ester
E/H/E	Eau dans l'huile dans l'eau
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
G	Gélatine
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
H/E	Huile dans l'eau
H/H	Huile dans l'huile
HYP	Hydroxy-proline
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOX	Lipo-Oxygénase
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MEB	Microscopie électronique à balayage
n-3	Oméga-3
PRO	Proline
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RXR	Récepteur X aux rétinoïdes
SGF	<i>Simulated gastric fluid</i>
SIF	<i>Simulated intestinal fluid</i>

SREBP-1c *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*

TG Triglycéride

ω 3 Oméga-3

RÉSUMÉ

Les oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels, non synthétisable par le corps humain. Leur apport par l'alimentation (poissons gras) ou par supplémentation est nécessaire. Les suppléments d'oméga-3 ($\omega 3$) sont souvent sous forme de gélules, billes ou microbilles. Les inconvénients de ce type de formulation sont le coût élevé, l'oxydation de l'huile $\omega 3$ à l'air et à la lumière, ou encore à la faible biodisponibilité pour l'absorption intestinale. Ce dernier inconvénient est probablement dû d'une part au long temps de rétention de la capsule dans le milieu gastrique et d'autre part à la flottaison de l'huile à la surface de ce même milieu. L'objectif principal de la présente recherche a été d'élaborer une nouvelle formulation des huiles $\omega 3$ sous forme de poudre permettant de produire des comprimés afin de protéger les $\omega 3$ des facteurs dénaturants et de permettre une absorption plus efficace. Pour y parvenir, le carboxyméthyl amidon (CMA) a été utilisé comme matrice pour la libération ciblée des $\omega 3$ au niveau intestinal. Le CMA a déjà été proposé comme excipient pour la libération contrôlée de petites molécules ou encore d'agents bioactifs. Il a également été complexé avec la lécithine, un diglycéride, afin d'obtenir une matrice plus hydrophobe pour une libération retardée. Bien que le CMA semble convenir à l'inclusion des $\omega 3$, ce complexe présente une faible résistance à la compression (expulsion de l' $\omega 3$ des cavités hélicoïdales). Dans ce contexte, une nouvelle approche a été utilisée afin de stabiliser la formulation qui consiste en l'addition de gélatine (G). Le complexe CMA- $\omega 3$ /G a été obtenu par traitement à haute température (100°C) du mélange CMA, $\omega 3$ et G. La structure du complexe CMA- $\omega 3$ /G a été élucidée à l'aide du test d'iode, des analyses d'infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et par diffraction des rayons-X (DRX). Les résultats ont montré que les chaînes aliphatiques des $\omega 3$ se sont insérées à l'intérieur de la cavité hélicale du CMA, tandis que la gélatine restée à l'extérieur, jouait le rôle d'assembleur dans le complexe grâce aux interactions ioniques entre la G et le CMA. L'étude des profils de dissolution a montré une libération non significative des $\omega 3$ dans le milieu gastrique (2h) et une libération soutenue dans le milieu intestinal (site d'absorption). Le test de stabilité de la poudre CMA- $\omega 3$ /G a montré une bonne capacité de protection contre l'oxydation de l'ordre de 70 % après 1 h d'exposition au rayonnement UV comparativement à l'huile $\omega 3$ sans enrobage dont la capacité de protection était indétectable. Ce complexe CMA- $\omega 3$ /G est différent des complexes amylose avec des acides gras de type mono ou diglycérides inclus dans la structure hélicoïdale. À notre connaissance, cette étude est une des premières à avoir mis en évidence l'inclusion des acides gras de type triglycérides dans la structure de l'amidon modifié par carboxyméthylation. L'utilisation de ce complexe peut présenter des intérêts dans l'industrie alimentaire (enrichissement alimentaire), dans le domaine nutraceutique en encore dans l'industrie pharmaceutique comme excipient pour des molécules sensibles aux facteurs dénaturants.

Mots clés : Carboxyméthyl amidon, Oméga-3, Gélatine, Complexe, Libération ciblée, Intestin, Oxydation.

CHAPITRE I

L'HUILE OMÉGA-3, RÔLE EN NUTRITION

1.1 Oméga-3 – Structure, sources et biosynthèse

Les oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés car ils portent plusieurs doubles liaisons sur leur chaîne aliphatique.

Les principaux acides gras du groupe oméga-3 sont (Figure 1.2) :

- l'acide α -linolénique (nomenclature : C18:3 n-3 ; abréviation : AAL)
- l'acide éicosapentaénoïque (nomenclature : C20:5 n-3; abréviation : AEP)
- l'acide docosahexaénoïque (nomenclature : C22:6 n-3; abréviation : ADH)

Ces principaux acides gras polyinsaturés (AGPI) sont issus de l'acide α -linolénique par une suite de réactions d'élongation et de déshydrogénation. Ces dernières sont limitantes car inefficaces, voire absentes dans l'organisme humain. Les oméga-3 ne sont donc pas synthétisés par le corps humain, d'où la qualification d'acide gras « essentiels ».

L'intérêt suscité par les oméga-3 est né en partie des observations de maladies de carences provoquées par un régime totalement dépourvu d'acides gras. L'essentialité des AGPI a été découverte par Burr et Burr (1929) en soumettant des jeunes rats à un régime dépourvu de lipides. Les symptômes observés étaient : retard de croissance, chute de poils, dessèchement et desquamation de la peau. Plusieurs études épidémiologiques réalisées au milieu des années 1970, ont suggéré que les esquimaux du Groenland bénéficiaient d'une protection relative contre les maladies cardiovasculaires (MCV) et contre l'athérosclérose (Bang et Dyerberg, 1971) en raison d'une forte consommation d'animaux marins : poissons gras, phoques, baleines. Quelques années plus tard, et pendant les décennies qui suivirent, de nombreux travaux épidémiologiques, expérimentaux et cliniques ont fourni des preuves substantielles suggérant que la consommation alimentaire régulière d'acides gras oméga-3, avec une mention particulière pour les acides éicosapentaénoïque (AEP) et docosahexaénoïque (ADH), pourrait être associée à des effets bénéfiques dans divers domaines, notamment les maladies cardiovasculaires, athéromateuses, immunologiques, inflammatoires et cancéreuses.

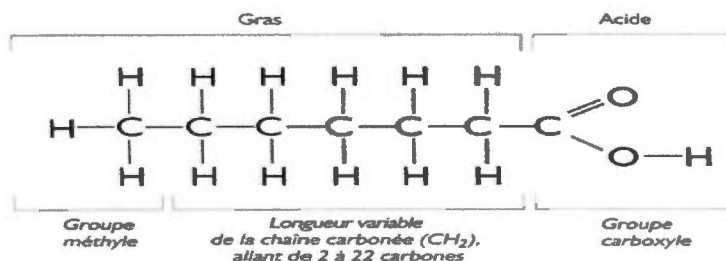


Figure 1.1: Structure générale des acides gras.

Les acides gras sont constitués d'une chaîne carbonée avec un groupement carboxyle (COOH) et un groupement méthyle (CH₃) de chaque extrémité (Figure 1.1).

Il y a plusieurs huiles contenant des acides gras non saturés de type oméga-3, ces huiles seront appelées dans ce manuscrit «oméga-3 (omega3)». Les oméga-3 (omega3, n-3) sont appelés ainsi car la double liaison la plus proche du groupe méthyle terminal est portée par le carbone se trouvant à la position 3 de cette extrémité selon la nomenclature biochimique.

La famille des oméga-3 compte l'acide α -linolénique (AAL), précurseur de deux acides gras essentiels; l'acide éicosapentaénoïque (AEP) et l'acide docosahexaénoïque (ADH) qui sont considérés comme AGPI à longue chaîne (LC) car leur chaîne carbonée est composée de plus de 18 atomes de carbone.

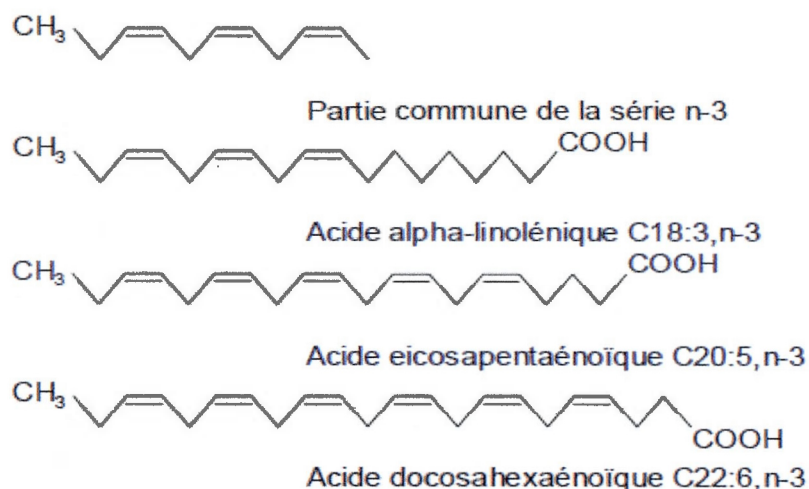


Figure 1.2 : Structures des acides gras de la série n-3 où C22 représente le nombre de carbone, 6 représente le nombre de doubles liaisons et n-3 la position de la première double liaison, c'est-à-dire le carbone numéro 3.

Le précurseur d'oméga-3, AAL provient de sources alimentaires végétales issues des huiles de soja, colza, noix et lin. Les AGPI-LC, AEP et l'ADH, quant à eux, proviennent essentiellement des fruits de mer comme le krill et du poisson, qui consomment des algues, premiers producteurs d'AEP et d'ADH. Les poissons gras en sont particulièrement riches (Bourre et Paquette, 2007).

Les APGI-LC peuvent être obtenus par la voie de biosynthèse à partir du précurseur AAL. En effet l'acide α -linolénique possède la première double liaison située sur le carbone 3, impossible à introduire par l'homme ou les animaux mais réalisée par les végétaux par deux réactions de déshydrogénations successives par les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$. Cependant les animaux, particulièrement marins, ont la capacité d'ajouter à l'acide α -linolénique des doubles liaisons à l'extrémité carboxyle et allonger la chaîne carbonée par la

même extrémité avec une suite de déshydrogénation (désaturase $\Delta 6$), d'élongation (élongase ϵ) suivie d'une déshydrogénation supplémentaire (désaturase $\Delta 5$) afin d'obtenir de l'AEP et de convertir ce dernier en ADH suite à une série d'élongation et déshydrogénation par la désaturase $\Delta 6$ (Figure 1.3) (Innis et coll., 2008). La deuxième famille des AGPI, oméga-6 est obtenue en utilisant des désaturases communes aux oméga-3; il en découle donc une compétition entre les deux familles pour l'obtention et la biodisponibilité des acides gras dérivés (Legrand, 2003). Ces acides gras essentiels sont indispensables pour certaines fonctions biologiques (production de médiateurs oxygénés bioactifs: d'eicosanoïdes). Ne pouvant être synthétisés par l'organisme, ils doivent donc être apportés par l'alimentation.

1.2 Fonctions des oméga-3

Les AGPI précurseurs et leurs dérivés à longue chaîne ont de multiples rôles dans divers processus physiologiques, principalement dans la modulation des propriétés physico-chimiques et dynamiques des membranes cellulaires, dans la synthèse de médiateurs lipidiques oxygénés hautement spécifique et dans la transcription des gènes par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de transcription comme les récepteurs nucléaires sensibles aux AGPI.

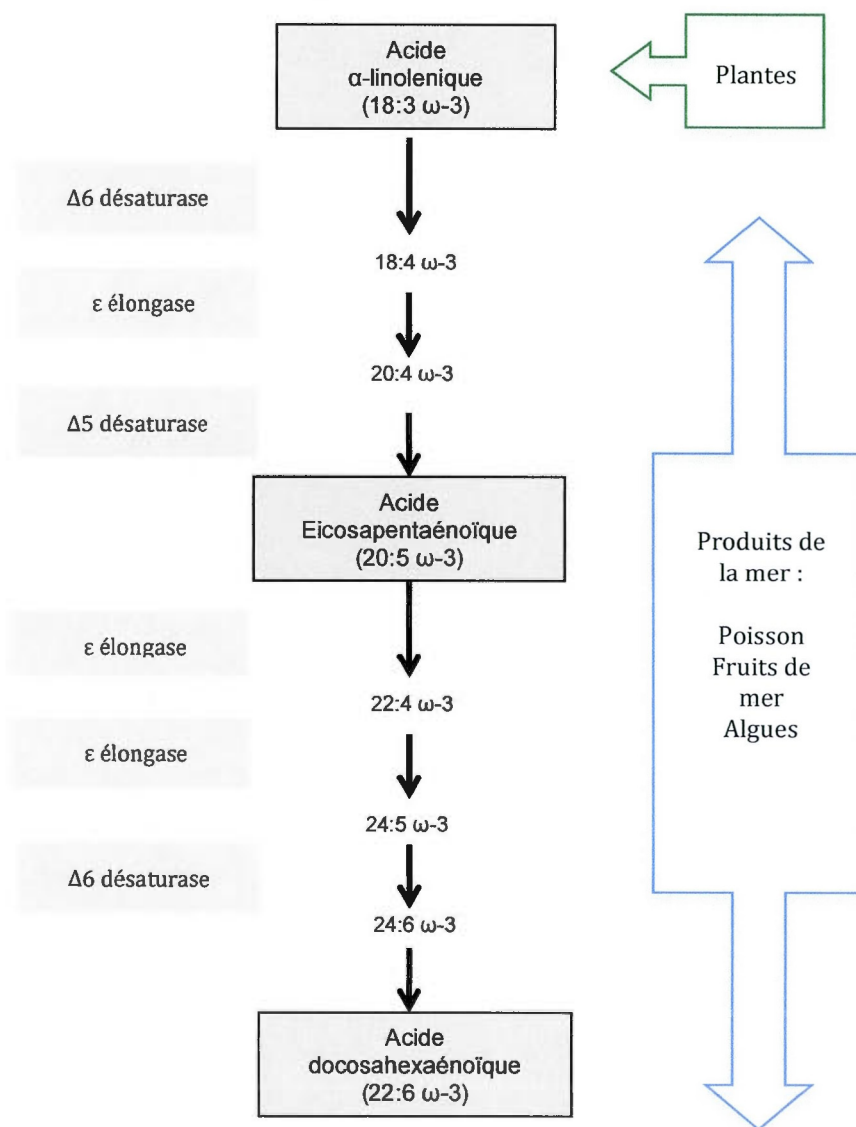


Figure 1.3 : Voie de biosynthèse des oméga-3 (ω -3) (d'après Innis et coll., 2008).

1.2.1 Rôle structural

Les acides α -linoléniques et docosahexaénoïque sous forme de phospholipides sont des constituants universels et fondamentaux des membranes cellulaires (Arterburn et al., 2006). Ils contrôlent l'activité de nombreuses enzymes, transporteurs, récepteurs et surtout la fluidité membranaire, en modulant des canaux ioniques.

La concentration élevée de l'ADH dans les cellules photo-réceptrices permet des changements conformationnels des pigments rétiniens (Rhodopsine) (Niu et al., 2004). L'ADH joue un rôle dans la ségrégation des domaines membranaires de radeaux lipidiques (raft) (Shaikh et al., 2004). D'autres implications structurales indirectes ont été mises en évidence concernant la modulation de la biosynthèse de phospholipides membranaires régulant certaines voies de signalisation comme les protéines kinases C et l'apoptose (Kim et al., 2004).

1.2.2 Précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs

Certains phospholipides membranaires libérés par l'action des phospholipases peuvent être métabolisés par la voie des cyclo-oxygénases et la voie des lipoxygénases produisant des molécules bioactives (Figure 1.4) (Din et al., 2004). Ces médiateurs lipidiques (eicosanoïdes) régulent différentes fonctions telles que la physiologie cardiaque, l'hémostase, l'agrégation plaquettaire, l'activité du système immunitaire, l'inflammation, etc.

Parmi les principales fonctions exercées par les eicosanoïdes comme les prostanoïdes de la série 3 tels que les prostaglandines (PGE₃), issus de l'AEP,

citons la favorisation de la vasodilatation ou encore empêchement de l'agrégation plaquettaire par l'action des thromboxanes (TXA₃). Les leukotriènes de la série 5 possèdent des propriétés à tendance anti-inflammatoire, anti-arhythmique, vasodilatatrice et anti-thrombotique (Wall et al., 2010). À l'inverse, les eicosanoïdes issus des oméga-6 possèdent des propriétés à tendance pro-inflammatoire, athérogénique (vasoconstrictrice), pro-arhythmique et prothrombotique.

1.2.3 Rôle modulateur de la transcription génique

Les AGPI essentiels sont des régulateurs d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de transcription comme les récepteurs aux proliférateurs de peroxysomes (PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*), la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein-1c*), les facteurs nucléaires hépatiques (HNF4 : *hepatic nuclear factor 4*), le récepteur aux rétinoïdes (RXR : *retinoid X receptor*) et le récepteur hépatique X (LXR : *liver X receptor*). La régulation génique s'effectue dans les noyaux cellulaires par la liaison directe des AG avec ces récepteurs nucléaires (PPAR, HNF4, RXR et LXR) ou de façon indirecte en inhibant la transcription du récepteur lui même (SREBP-1c). Le tissu adipeux et hépatique sont les sièges de ces processus de régulation.

Les AGPI stimulent la voie catabolique par l'activation de la transcription de protéines de transport des acides gras et d'enzymes de la β -oxydation mitochondriale et peroxysomale. De plus, les AGPI peuvent réduire l'activité lipogénique des cellules hépatiques en régulant à la baisse la transcription de

facteurs et d'enzymes lipogéniques d'où leurs propriétés hypotriglycéridémiantes.

Les récepteurs PPARs jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de l'inflammation et du métabolisme lipidique (Figure 1.5). L'activation des PPARs (isoformes : PPAR α , PPAR γ) par les AGPI ou leurs métabolites oxygénés (prostanoïdes, leucotriènes), induit leur association avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) qui en se fixant sur la région régulatrice (PPRE) du promoteur des gènes cibles, modulent leur expression (Alessandri et al., 2004).

Les AGPI inhibent l'activité de SREBP-1c, facteur de la transcription qui s'exprime dans la plupart des tissus et régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse lipidique (Schmitz et Ecker, 2008), probablement via l'inhibition du LXR, activateur majeur de SREBP-1c. Cette inhibition pourrait être un effet indirect de l'activation des récepteurs PPARs. Enfin, l'activation des récepteurs PPARs par les oméga-3 et l'inhibition de SREBP-1c conduirait à une augmentation de la dégradation des lipides et à une diminution de la lipogenèse *de novo* des acides gras (acétylCoA synthase, acétylCoA carboxylase, acides gras synthase), mécanismes qui permettraient d'expliquer les propriétés hypolipidémiantes des AGPI n-3 à longue chaîne (Davidson, 2006).

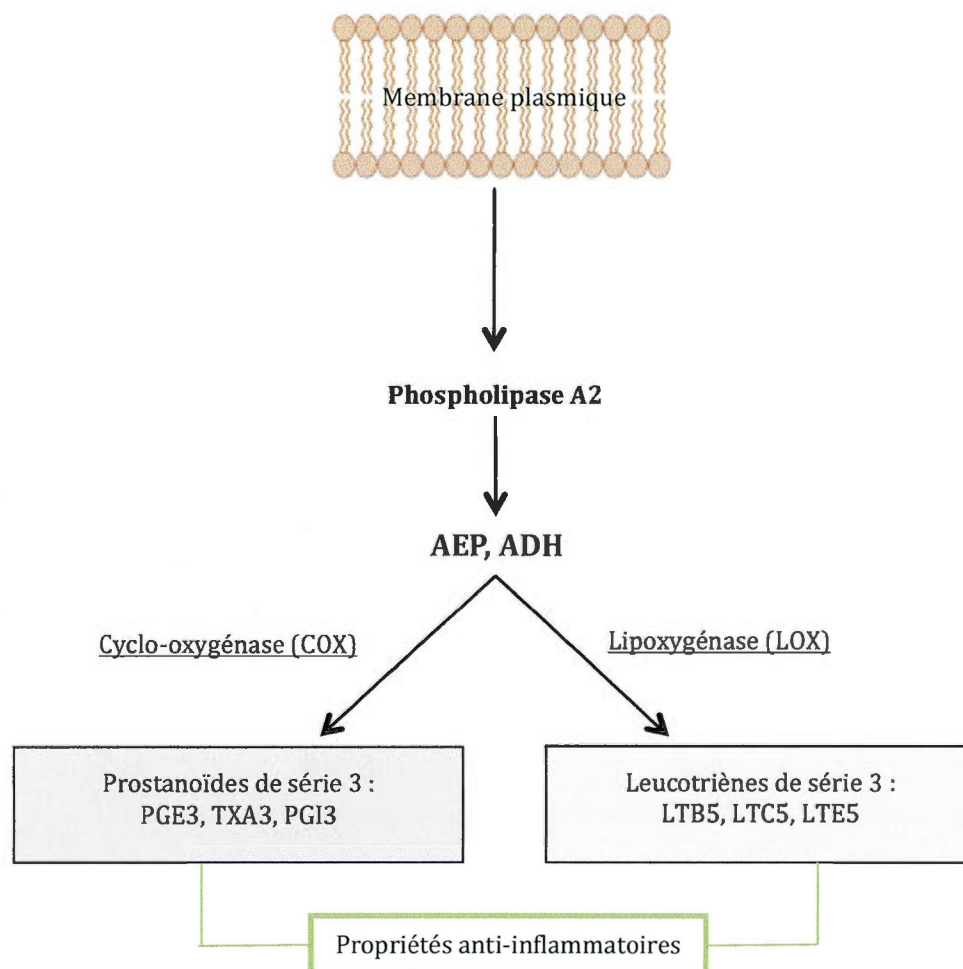


Figure 1.4 : Schéma de la synthèse des eicosanoïdes à partir des AGPI omega3.

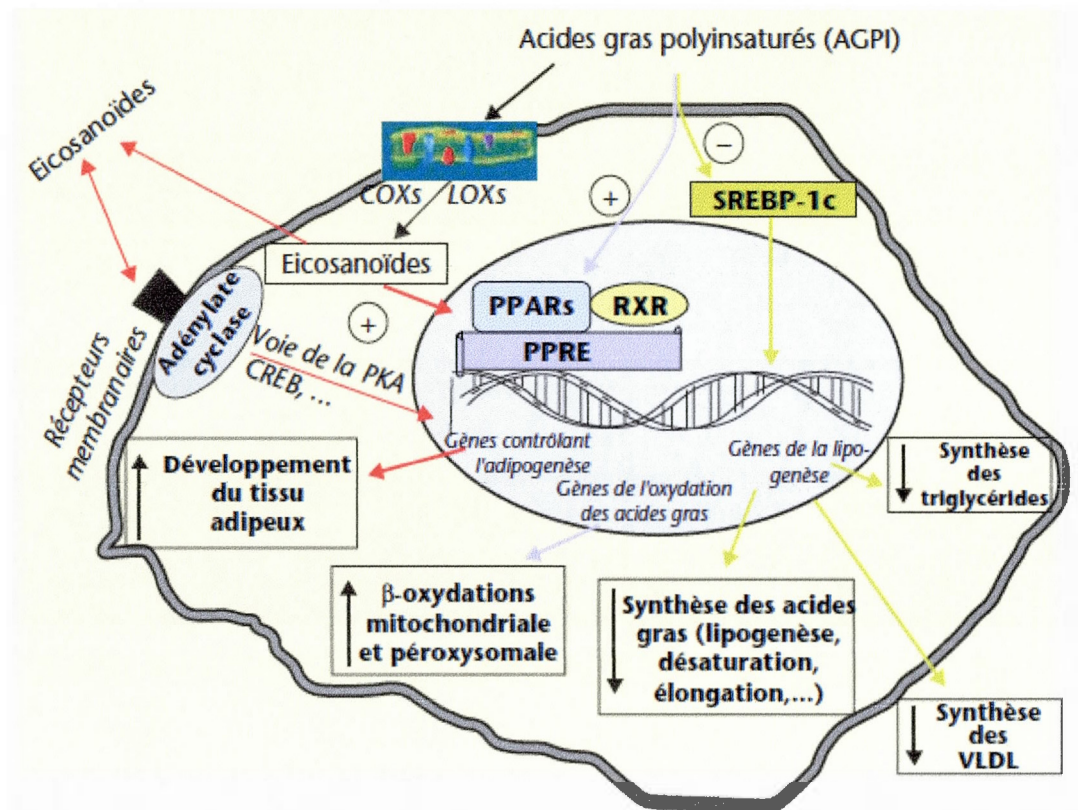


Figure 1.5 : Représentation schématique des effets des AGPI omega3 (d'après Guesnet et al., 2005) où COX: cyclo-oxygenases; LOX: lipoxygénases; PPAR: Proliférateurs de récepteurs à base de peroxysones; PPRE: élément de réponse au PPAR; RXR : récepteur aux rétinoïdes; SREBP-1c: protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols ; VLDL : *very low density lipoprotein*; CREB : élément de liaison protéique répondant à l'AMPc (*cAMP-responsive element binding protein*); PKA: protéine kinase a.

1.2.4 Effet sur le cerveau

Le cerveau est connu pour être l'organe le plus riche en ADH (Lukiw et Bazan, 2008). Cette concentration élevée, dans la bicouche lipidique des membranes neuronales, influence grandement leurs propriétés physico-chimiques, la production de médiateurs lipidiques dans les cascades de signalisation, l'activation de facteurs de transcription. L'ADH intervient également dans la régulation de la neurotransmission, la neurogenèse, l'énergétique cérébrale et la neuroprotection.

En effet, la richesse des membranes en AGPI n-3, particulièrement en ADH, leurs confère une grande fluidité (Saiz et Klein, 2001). Cette fluidité membranaire a pour résultat de faciliter la transmission du message nerveux, les échanges ioniques transmembranaires, la formation et la fusion des vésicules (Crawford, 2006). Des études expérimentales de résonance magnétique nucléaire ont montré la grande flexibilité de l'ADH, alors que les six doubles liaisons rigides de l'ADH suggèrerait l'inverse (Feller, 2008). La flexibilité conférée par l'ADH conditionne l'abondance et la distribution des radeaux lipidiques (« *lipid raft* ») (Florent-Bechard et al., 2007). Ces derniers, sont des microdomaines spécialisés de la membrane plasmique riche en cholestérol et en sphingolipides, jouant également le rôle de plateforme de recrutement pour des protéines impliquées dans des événements cellulaires importants comme le trafic membranaire, la morphogenèse cellulaire ou encore la signalisation cellulaire. En effet, les radeaux lipidiques sont des précurseurs de cavéoles (des invaginations de la membrane plasmique), impliquées dans les mécanisme d'endocytose et transcytose. Ces microdomaines pourraient moduler des mécanismes impliqués dans la neurodégénération (Florent-Bechard et al., 2007).

L'enrichissement des radeaux lipidiques en AGPI (AEP, ADH) entraîne une redistribution locale des lipides, un remodelage des membranes et un déplacement sélectif des protéines. Ces modifications auraient des conséquences majeures, comme par exemple la réduction de l'apoptose induite par l'accumulation de peptides de type β -amyloïde (caractéristique de la maladie d'Alzheimer), ou la modulation de l'expression de gènes majeurs (BACE et/ou PS1/PS2) de la cascade amyloïde (Hardy et Selkoe, 2002).

Enfin, l'ADH peut être métabolisé par des lipoxygénases, conduisant ainsi à la production de docosanoïdes bioactifs. Ces dérivés oxygénés comprennent : résolvines, docosatriènes, neuroprotectines et neuroprostanes, particulièrement importantes dans le cerveau où ils ont une action anti-inflammatoire et neuroprotectrice (Bazan, 2006 ; Laye, 2010). L'étude des docosanoïdes a permis notamment l'identification de la neuroprotectine D1 (NPD1), dérivée de l'ADH par la 15-LOX qui joue des rôles dans le système nerveux central (SNC), dans les processus d'apoptose et module la synthèse de médiateurs d'inflammation (Niemoller et Bazan, 2010).

1.2.5 Effet cardioprotecteur

Les effets cardiovasculaires bénéfiques des oméga-3, en particulier des AEP et ADH, sont bien documentés. Parmi les plus proposés, l'effet anti-arythmique, la réduction de la tension artérielle, de l'agrégation plaquettaire, de l'inflammation, de la réactivité vasculaire et enfin la réduction du taux de triglycérides. Cet effet hypotriglycéridémiant est attribué à une augmentation de la lipolyse par les récepteurs PPARs, à une augmentation de la β -oxydation des AG et à l'accroissement de l'activité des lipoprotéines lipases, induisant ainsi une baisse

des niveaux de triglycérides sanguins (Nagao et Yanagita., 2008, Anil., 2007, Harris et Bulchandani., 2006). Un léger effet, en revanche, sur le taux de cholestérol associé aux LDL (*Low Density Lipoprotein*) facteurs de risque de l'athérosclérose et HDL (*High Density Lipoprotein*), leur est associé (Anil, 2007). Des effets potentiellement délétères sur le profil des LDL ont été observés et des études ont montré que, la consommation d'AGPI n-3 était associée à une diminution du taux de production des particules les plus délétères, les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (Harris et Bulchandani, 2006).

De façon générale, les huiles de poisson semblent exercer une action bénéfique sur les plaques athéromateuses en favorisant leur stabilisation, probablement par leur effet anti-inflammatoire, malgré leurs effets potentiellement antagonistes sur le profil lipidique.

1.3 Recommandations pour l'apport en AGPI n-3

Le développement de certaines maladies chroniques a explosé dans le monde occidental, depuis quelques années, en même temps que la consommation d'oméga-6 a augmenté, alors que celle des oméga-3 a été oubliée. Cette insuffisance d'apport a conduit la communauté scientifique à formuler, en guise de prévention, conjointement avec les instances internationales, des recommandations concernant les apports en oméga-3 afin de garantir un apport nutritionnel suffisant et prévenir des maladies cardiovasculaires. Plusieurs études d'intervention, dont les essais DART (Burr et al., 1989) et *GISSI-Prevenzione* en 1999, traitant ce sujet ont prouvé l'efficacité d'une consommation élevée en aliments riches en oméga-3 (poissons) ou en suppléments d'oméga-3.

Il est recommandé de consommer entre 0,6 à 1,2%, dépendamment du sexe, d'énergie provenant des AGPI, pour garantir un apport nutritionnel suffisant permettant de prémunir les symptômes de déficience. En ce sens, les Départements de l'Agriculture et de la Santé des États-Unis, préconisent, en 2005, pour diminuer le risque de maladies cardiovasculaires en prévention primaire, de consommer deux portions de poisson par semaine (environ 230 g selon le Département de l'Agriculture américain), ce qui vaut deux fois la consommation habituelle de la population américaine.

Une portion de poisson provenant d'un poisson gras, correspond à environ 500 mg/j d'AEP+ADH tel que recommandé par l'ISSFAL (*International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*) ou par les *Apports Nutritionnels Recommandés* (ANR) français (Martin, 2001). D'autres organisations nationales et internationales (OMS, Organisation Mondiale de la Santé) ont également exprimé des recommandations allant dans le même sens (Gebauer et al., 2006). En prévention secondaire, la consommation de 1 g/j ou plus d'AEP+ADH est recommandée par l'Association Américaine de Cardiologie et par la Société Européenne de Cardiologie, ce qui peut être apporté par l'utilisation de suppléments à base d'huile de poisson ou d'aliments enrichis en AEP et ADH.

CHAPITRE II

L'AMIDON ET LE CARBOXYMÉTHYL AMIDON COMME EXCIPIENTS PHARMACEUTIQUE

2.1 L'amidon-Structure et propriétés

L'amidon est un polysaccharide semi cristallin d'origine végétale, composé d'unités de glucose. Il est la principale substance de réserve, la plus abondante des plantes supérieures, synthétisé à l'aide de l'énergie solaire. Il se trouve stocké dans des organes de réserve de végétaux, sous forme de granules, dans les céréales (blé, maïs), racine et tubercules (pomme de terre), ainsi que dans des légumineuses. La taille et la forme des granules sont spécifiques à chaque espèce végétale.

La structure chimique de l'amidon a été déterminée par l'analyse de ses produits de dégradation après hydrolyse acide totale (Saussure, 1819). Ainsi, il a été montré que l'amidon est composé d'un mélange de deux familles d'homopolymères d' α -D-glucopyranose (ou α -D-glucose ou encore anhydroglucose) liés par des liaisons de type éther, appelées *glycosidiques*, en

conformation α . Les deux homopolymères, amylose et amylopectine, composent l'amidon à 98-99%.

L'amylose, (Figure 2.1), représente 20 à 30% de l'amidon suivant son origine botanique. Il s'agit d'une macromolécule de nature polysaccharidique non ramifiée constituée de résidus D-glucopyranose liés par des liaisons $\alpha(1-4)$ (Wang et al., 2003). Toutefois, l'amylose peut contenir 1% de branchement $\alpha(1-6)$ (Duprat et al., 1980). L'amylose possède deux extrémités avec des fonctions différentes, en position C4 se trouve l'extrémité non réductrice et en position C1 l'extrémité réductrice due à une fonction hémiacétalique de l'alcool terminal. L'amylose native contient 500 à 6000 unités de glucose selon l'origine végétale, réparties en plusieurs chaînes dont le degré de polymérisation (DP) est de l'ordre de 500 (Buléon et al., 1990).

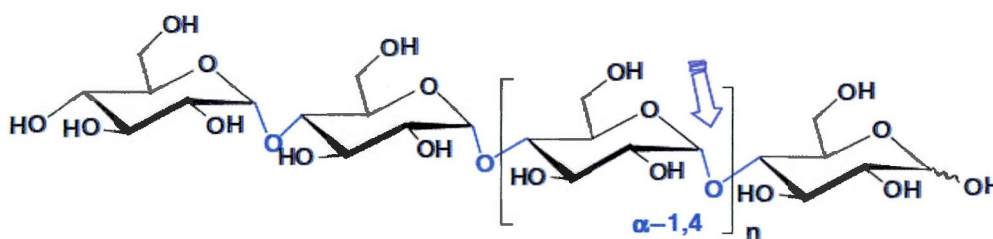


Figure 2.1: Structure de l'amylose.

Du fait de son caractère non ramifié et flexible induit par les liaisons $\alpha(1-4)$, l'amylose a la capacité de former des hélices qui peuvent complexer diverses molécules hydrophobes telles que les acides gras, iode moléculaire, chaînes hydrocarbonées ou encore des agents tensioactifs (Buléon et al., 1990). Des études du comportement hydrodynamique de l'amylose en solution montrent

que le polymère s'organise en hélice, créant une cavité pouvant héberger des molécules hydrophobiques (Banks et Greenwood, 1971).

L'amylopectine rentre dans la composition de l'amidon à raison de 70 à 80%. Cette macromolécule (Figure 2.2) est formée par des résidus glucidiques principalement reliés entre eux par des liaisons α (1-4) et par des liaisons α -(1-6) à l'origine des ramifications; ces dernières représentent un taux de branchement d'environ 4 à 5% (Oates, 1997). L'amylopectine se compose de trois types de chaînes distinctes (Tester et al., 2004):

- i) Chaînes courtes (A ou S, Short) avec un degré de polymérisation (DP) moyen entre 15 et 20 unités de glucose.
- ii) Chaînes longues (B ou L, Long) qui forment le squelette possédant un DP compris entre 40-45 (unités de glucose).
- iii) Chaînes avec un DP supérieur à 60 (peu fréquentes comparativement aux deux autres).

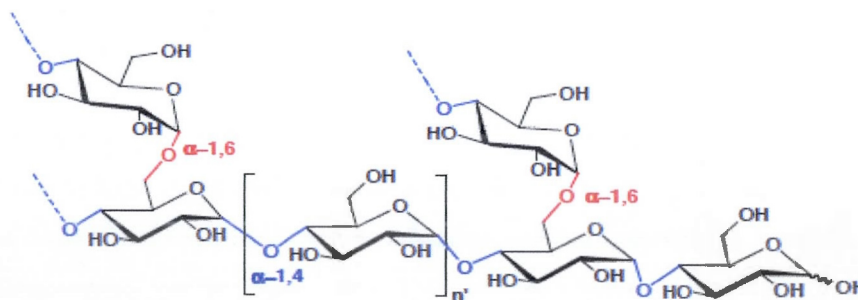


Figure 2.2: Structure de l'amylopectine.

Un modèle a été accepté pour schématiser la macromolécule d'amylopectine qui est le modèle en grappes. Dans ce modèle, les chaînes B forment l'ossature de la macromolécule et supportent les «grappes», deux en moyenne, constituées par les chaînes A (Robin et al., 1974). Des analyses enzymatiques ont montré que les points de branchement n'étaient pas distribués de manière aléatoires (O'Sullivan et Pérez, 1999; Gérard et al., 2000).

L'amylose et l'amylopectine présentent des propriétés différentes. Par exemple, la dégradation de l'amylose par la β -amylase (enzyme) est de l'ordre de 100%, tandis que celle de l'amylopectine est d'environ 50 à 60%. Un autre exemple: l'amylose a la capacité de pouvoir former des gels visqueux fermes contrairement à l'amylopectine qui a tendance à fournir des gels de moindre viscosité (Pérez et Bertoft, 2010).

La distribution générale en amylose dans les granules d'amidon est de 20 à 30% et en amylopectine de 70 à 80%. Ce ratio peut être modifié grâce aux manipulations génétiques. Ainsi, ont été obtenu, à des fins commerciales, l'amidon de type Hylon® V (*National Starch-USA*) contenant 57% d'amylose et l'amidon de type Hylon® VII qui contient 71% d'amylose. Ces différences de pourcentages peuvent conduire à des changements appréciables dans les propriétés physiques et dans la fonctionnalité de l'amidon.

2.1.1 Structure granulaire de l'amidon :

Les granules d'amidon sont des entités semi-cristallines ordonnées. L'organisation de ces dernières résulte de l'arrangement en alternance de l'amylose et de l'amylopectine en zones amorphes et cristallines disposées de

manière concentrique à partir du hile (point de départ de la croissance des macromolécules) (Figure 2.3).

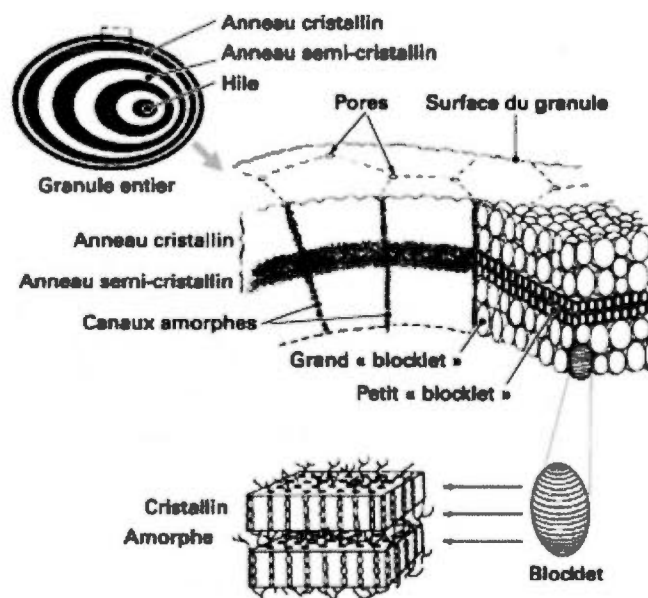


Figure 2.3 : Présentation schématique de la structure cristalline du grain d'amidon à différents niveaux d'organisation; grain entier, alternance de zones cristallines et amorphes, structure des unités cristallines « blocklet » (d'après Gallant et al., 1997).

Les formes cristallines ont été mises en évidence à l'aide du diagramme de diffraction des rayons X. Ainsi, l'amidon se trouve sous quatre formes morphologiques : le type A, B, C et V. Le type A est caractéristique des amidons de céréales (amidon de blé et de maïs cireux), tandis que le type B est caractéristique des amidons de tubercules et de céréales riches en amylose. Le type C est caractéristique des amidons de légumineuses et son diffractogramme correspond à un mélange des deux types de cristallins: A et B (Biliaderis, 1991). Enfin, le type V caractérise l'amylose pouvant former des complexes avec des

molécules complexantes comme l'iode, alcools ou acides gras (de type monoglycéride) (Buléon et al., 1998).

Les structures allomorphes de type A et B sont organisées en doubles hélices gauches à 6 unités de glucose par tour, empaquetées de façon antiparallèle. En fait, les deux allomorphes A et B ne diffèrent que par leur agencement au sein de la maille cristalline. Le type A correspond à une maille de type monoclinique tandis que le type B correspond à une maille hexagonale (Hsein-Chih et Sarko, 1978a; 1978b). Une autre différence à noter entre les deux formes est la quantité d'eau que les mailles peuvent contenir. Ainsi, un nombre de quatre molécules d'eau est inséré entre les doubles hélices de la forme A (Figure 2.4), tandis que la cavité de la forme B (Figure 2.5) peut contenir jusqu'à 36 molécules d'eau (Hsein-Chih et Sarko, 1978a). Les conditions d'obtention de l'un de ces deux allomorphes sont bien connues. Ainsi, une température basse et une forte humidité engendrent principalement la formation de l'allomorphe B (exemple de tubercules de pomme de terre), alors qu'à une température élevée et une humidité relative faible, l'allomorphe A est majoritairement synthétisé (dans le cas d'une graine de céréale) (Tester et al., 2004).

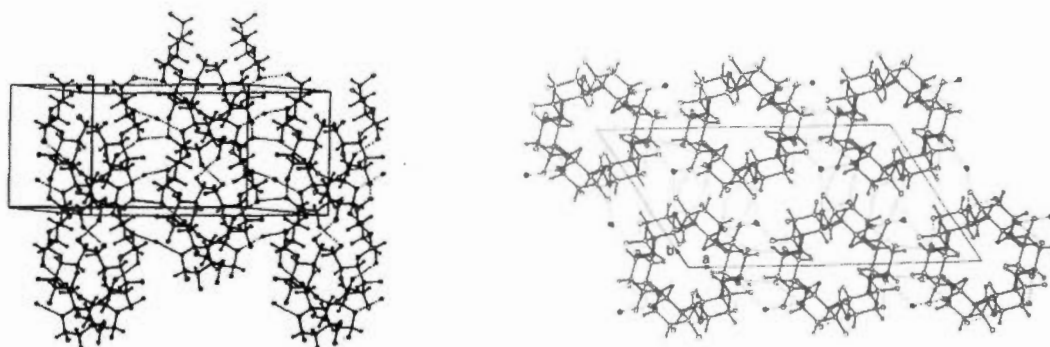


Figure 2.4: Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe A avec molécules d'eau (•) (d'après Imberty et al., 1988a).

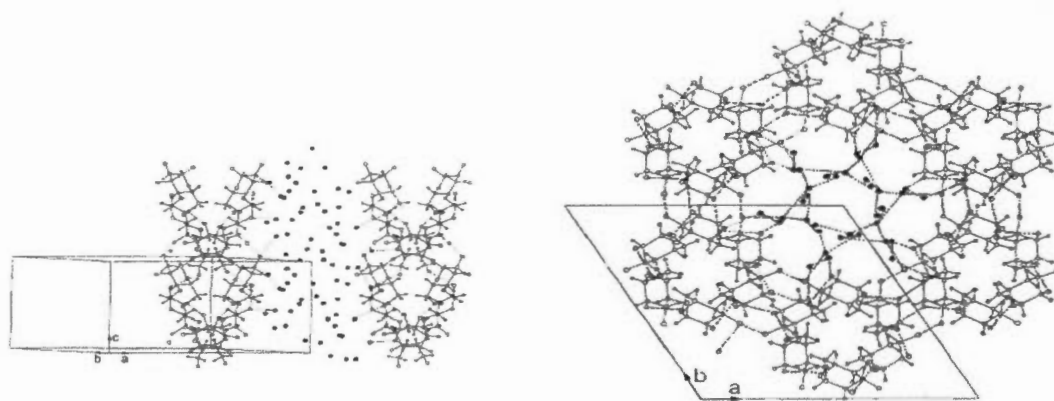


Figure 2.5: Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe B avec molécules d'eau (•) (d'après Imberty et al., 1988b).

Les études par diffraction de rayons X ont permis d'établir que l'amylose V obtenu suite à un traitement par chauffage diffère des allomorphes A, B ou C. Ainsi, l'amylose V adopte une configuration hélicoïdale (sous forme simple hélice) avec 6 unités de glucose par tour d'hélice. La cavité centrale de l'amylose de type V se trouve être plus large que celle formée par les types A et B (Figure 2.6), ce qui permet à différentes molécules de s'y loger. De cette façon, l'amidon peut former des complexes avec diverses molécules tout en étant stabilisé par des liaisons hydrogène. Par exemple, l'amidon forme un complexe bleu en présence d'iode (Bates, 1948).

**Double Hélice,
forme-A**

**Simple Hélice,
forme-V**

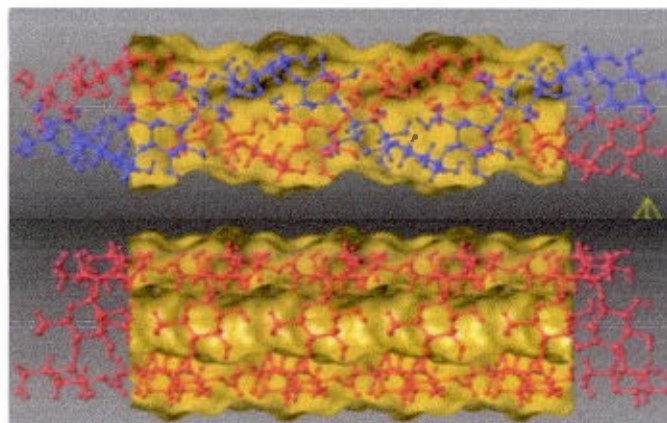


Figure 2.6: Géométrie moléculaire de l'amylose double hélice de forme-A et simple hélice de la forme-V (d'après Immel et Lichtenthaler, 2000).

2.1.2 Transformations hydrothermiques

L'eau joue un rôle majeur dans les propriétés thermiques de l'amidon ainsi que dans sa cristallinité. En effet, les grains d'amidon sont insolubles à la température ambiante. À des températures supérieures à 60°C, le grain d'amidon subit des transformations successives illustrées dans la figure 2.7. À la température ambiante, l'humidité relative de l'atmosphère influence la cristallinité du grain. C'est le phénomène de sorption. Dès qu'on atteint une température avoisinant 60°C et en présence d'excès d'eau, le phénomène d'empesage (ou gélatinisation) se met en place. Enfin, lors du refroidissement de la température, il se produit une gélification par rétrogradation de l'amidon.

2.1.2.1 La solubilité

Les granules d'amidon gonflent au contact de l'eau. Ainsi, les molécules d'eau occupent rapidement les zones amorphes du granule, ce qui aura pour résultat la formation de ponts d'hydrogène de l'eau avec les chaînes d'amylose et d'amylopectine. Il est possible, en chauffant la suspension d'amidon ou en lui additionnant une solution alcaline, de dissoudre les granules d'amidon. Ce processus se fait en deux étapes: la solubilisation de l'amylose qui sort du granule et la destruction du grain avec la libération de l'amylopectine (Zobel, 1988).

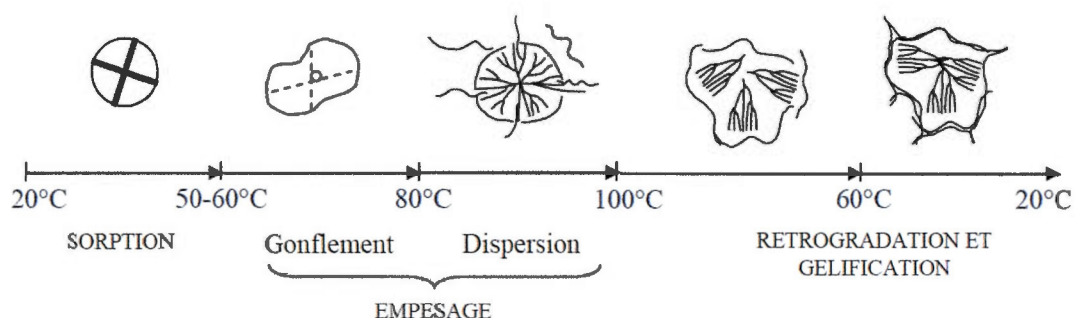


Figure 2.7: Représentation schématique de la transformation d'un grain d'amidon en fonction de la température (d'après Buléon et al., 1990).

2.1.2.2 La gélatinisation

La gélatinisation ou encore l'empesage est un processus à la suite duquel un chauffage des granules d'amidon à des hautes températures (supérieure à 60°C) en présence d'un excès d'eau, induit un gonflement irréversible du grain (Zobel et al., 1988a; Donovan, 1979) et la solubilisation du contenu granulaire (l'amylose amorphe se solubilise). Lors du chauffage, les zones amorphes du grain d'amidon absorbent l'eau provoquant un gonflement irréversible de ces zones. Ce gonflement conduit à la rupture des liaisons hydrogène et à une perte de la structure semi-cristalline du grain d'amidon. Ce phénomène est la conséquence de la perte simultanée de l'arrangement lamellaire des doubles hélices d'amylopectine, de leur structure en double hélice et de la structure granulaire (Jacobs et Delcour, 1998; Stute, 1992). Le comportement lors de la gélatinisation dépend de l'origine botanique et éventuellement du génotype.

2.1.2.3 La gélification

Le processus de gélification (Figure 2.7) consiste en la formation d'un gel blanc opaque suite au refroidissement de la dispersion d'amidon gélatinisé. Le réarrangement des chaînes d'amylose est considéré comme le principal responsable de ce phénomène, qui est dû à l'association des chaînes d'amylose par des liaisons hydrogène aboutissant à la formation d'un réseau tridimensionnel. Ces associations moléculaires, détruites par le chauffage, sont rétablies, possiblement dans une autre structure, lors du refroidissement.

Ces réarrangements sont à la base du développement de la texture du gel qui sera d'autant plus rigide que la concentration en amylose sera importante (Malumba, et al., 2011). Toutefois, la gélification de l'amylose est un processus cinétique dont la rapidité va dépendre de la concentration en amidon ainsi que de sa teneur en amylose.

2.1.2.4 La rétrogradation

La rétrogradation est un processus qui suit la gélification et qui désigne la réorganisation structurale (ou recristallisation). Il s'opère lors du refroidissement d'une dispersion d'amidon déstructuré. Ce phénomène se traduit par une diminution de la viscosité, une augmentation de la turbidité et la résistance aux attaques enzymatiques. Ainsi, la rétrogradation entraîne un resserrement de la texture du gel qui provoque l'expulsion de l'eau incluse entre les chaînes des macromolécules (Néel, 1965). La rétrogradation (Figure 2.8) se caractérise par une transition de la forme pelote statistique vers la forme organisée de double hélice (Buléon et al., 1990).

Il est bien établi que ce processus dépend de la teneur en eau et de la température. Ainsi, la recristallisation est contrôlée par la teneur en eau pendant le stockage et non pas pendant la gélatinisation. Pour avoir une rétrogradation de bonne efficacité, un taux de 40 à 70% d'eau est nécessaire.

La vitesse de recristallisation de l'amylopectine augmente avec la température. Toutefois, un ralentissement de la cristallisation est observé à 90°C, probablement dû à une séparation de phase des constituants de l'amidon, car l'amylose et l'amylopectine sont incompatibles en solution (Miles, 1985)

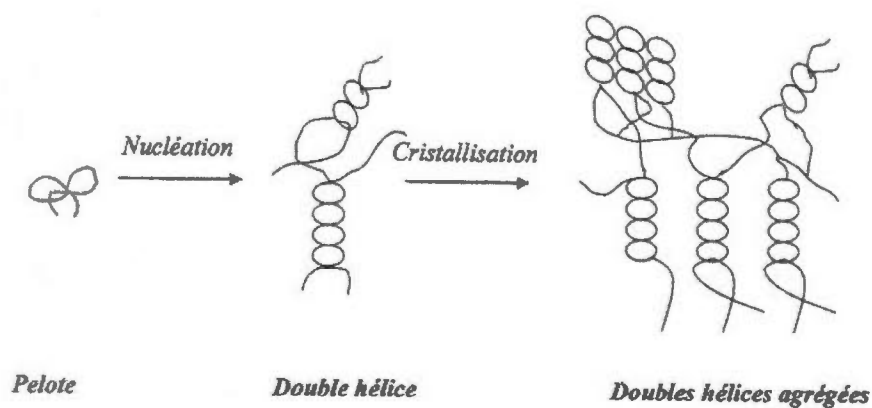


Figure 2.8 : Représentation schématique de la recristallisation pendant la rétrogradation (d'après Buléon, 1990).

2.1.3 Formation des complexes amylose-lipides

Les graines d'amidon provenant de céréales contiennent des lipides de surface de type triglycérides et des lipides internes exclusivement monoacylés (acides gras libres, lysophospholipides notamment lysophosphatidylcholine). Ces lipides internes sont présents en quantité limitée dans les amidons de tubercules ou de légumineuses, et en quantité supérieure dans les amidons de céréales (de 0,6 à 0,8 % pour le maïs et de 0,8 à 1,2 % pour le blé).

L'ajout de lipides à des aliments à base d'amidon, a toujours eu un grand intérêt agro-alimentaire. Ainsi l'incorporation d'émulsifiants lipidiques dans les produits boulangers améliore la saveur du produit final qui devient moins collant et plus stable à basse température. De plus, ils aident à retarder le rassissement et la rétrogradation de l'amidon. Le rassissement est le produit d'un changement de structure de l'amidon causé par la recristallisation de l'amylose. L'ajout de lipides comme la lécithine, forme des complexes d'inclusion avec l'amylose, ce qui empêche la recristallisation de l'amidon et prolonge les qualités gustatives des produits boulangers (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008).

Les lipides monoacylés ont la capacité de former des complexes d'inclusion dans l'hélice d'amylose (Figure 2.10). Cela conduit à un changement de la structure cristalline de l'amylose de la forme allomorphe A (doubles hélices) vers la forme V (simple hélice) caractérisée par une moindre cristallinité. Des études ont montré que l'amylose sous la forme V est constituée de deux zones distinctes (Immel et Lichtenthahler, 2000) :

- i) une surface externe hydrophile;
- ii) une cavité hélicoïdale hydrophobe

Cette organisation favorise la formation du complexe d'inclusion à l'aide d'interactions hydrophobes qui peuvent se produire entre le lipide (chaîne aliphatique) et la cavité hélicoïdale de l'amylose (Godet et al. 1992).

2.1.4 Le carboxyméthylamidon :

Le carboxyméthylamidon (CMA) est un dérivé d'amidon intéressant pour ses nombreuses utilisations possibles. Il est, notamment, utilisé comme additif alimentaire, agent épaississant, agent gélifiant, agent lubrifiant, agent chélatant ou encore comme excipient pharmaceutique. Le CMA est produit par substitution des groupements hydroxyles du polysaccharide (amidon) avec de l'acide monochloracétique utilisé comme agent de substitution. Ainsi, des groupements carboxyliques ionisables sont introduits sur l'amidon (Figure 2.9). La méthode de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de montrer que la substitution des groupes hydroxyles par les groupes carboxyméthyles s'effectuait préférentiellement sur les oxygènes liés au carbone à la position 2, suivie de ceux du carbone à la position 6 et finalement sur ceux du carbone à la position 3 (Massicotte, Baille, Mateescu, 2008; Kragten et al., 1992; Calinescu et al., 2007; Laziket et al., 2002).

La carboxyméthylation induit une augmentation de la solubilité du CMA dans un milieu aqueux par rapport à l'amidon natif. La capacité du CMA à offrir une protection gastrique et une libération ciblée au niveau intestinal a fait de lui un excipient de choix pour la libération de différents agents actifs, tels que des petites molécules (Assaad et Mateescu, 2010), protéines ou encore des microorganismes (Calinescu, Mulhbachet et Mateescu, 2005 et 2007)

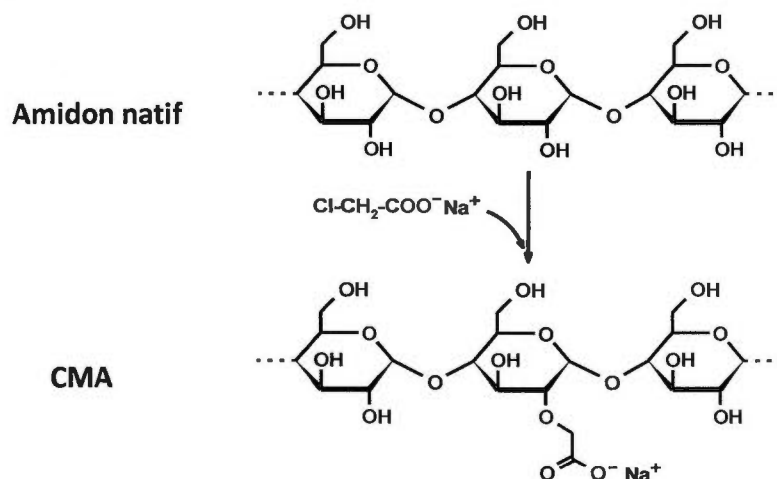


Figure 2.9 : Représentation schématique de la synthèse du carboxyméthylamidon.

En effet, au contact avec le fluide gastrique, la matrice à base de CMA semble offrir une certaine protection au principe actif. Ceci, est dû à la protonation des groupements carboxyliques provoquant une compaction de la matrice et induisant un retard de la pénétration du liquide à l'intérieur du comprimé. Lorsque celui-ci est transféré dans le milieu intestinal, le principe actif se libère progressivement suite à l'hydratation de la matrice. Dans ce cas, une déprotonation des groupements carboxyliques a lieu par un échange d'un proton pour un cation. La pénétration du fluide intestinal au sein de la matrice initie aussi une érosion enzymatique, dépendante de l'activité de l' α -amylase libérée par le pancréas (Massicotte et al., 2008) ainsi que du degré de substitution (DS). Des études de Lemieux et Mateescu (2009) ont montré que plus le degré de substitution est élevé, plus longue sera la libération du principe actif.

Malgré l'efficacité du CMA pour une libération contrôlée au niveau intestinal, il reste moins performant pour une libération retardée au niveau du côlon à cause

de sa grande solubilité dans l'intestin grêle. C'est pourquoi une matrice composée de carboxyméthyl amidon et de chitosane a été proposée pour enjambrer cette difficulté (Calinescu et Mateescu, 2008). Le chitosane est un polymère cationique naturel, dérivé de la chitine, présentant des propriétés intéressantes de biodégradabilité (Henriksen, Green et Smart, 1996; He, Davis et Illum, 1998) et de biocompatibilité (Tharanathan et Kittur, 2003). L'association de ces deux polymères, stabilisés réciproquement par des interactions ioniques, rend les comprimées de CMA-chitosane moins solubles à pH neutre et moins dégradables par les enzymes pancréatiques, permettant ainsi une libération retardée. Cette amélioration est due aux propriétés pH dépendantes du CMA (insoluble en milieu gastrique acide) et du chitosane (insoluble en milieu intestinal neutre).

Au pH acide, le chitosane est soluble et forme un hydrogel, limitant la pénétration du milieu gastrique et la diffusion du principe actif. Il est insoluble dans le milieu intestinal (pH neutre ou alcalin). À l'inverse, le CMA est compacté en milieu acide et solubilisé dans un milieu intestinal. Le comportement à la fois différent et complémentaire serait à l'origine de l'amélioration du comportement vis-à-vis de la libération des principes actifs.

La complexation du CMA avec le chitosane (Assaad et Mateescu, 2011) a généré un complexe dit polyélectrolyte (complexe formé de macromolécules stabilisées par plusieurs liaisons ioniques intermoléculaires, CPE) (Krayukhina, Samoilova et Yamskov, 2008). Les performances de ce nouveau complexe ont été comparées à celles du CMA par analyse d'imagerie RMN. Assaad et collaborateurs (2011) ont, ainsi, montré que la matrice CPE au contact d'un milieu neutre/basique s'hydratait plus lentement comparativement au CMA, ce qui favorise un temps de libération plus long.

Friciu et al., (2013), ont élaboré un complexe novateur à base de CMA et de lécithine (phosphatidylcholine), permettant d'augmenter les propriétés hydrophobes de la matrice afin de permettre la livraison ciblée au niveau de l'intestin grêle et au côlon d'un principe actif tel que la mésalamine (dérivé aminé de l'acide salicylique, administré comme traitement des maladies inflammatoires de l'intestin). Dans cette formulation, les chaînes alkyles de la lécithine ont été incorporées à l'intérieur de la cavité hélicoïdale du CMA (Figure 2.10).

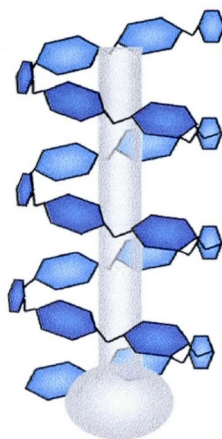


Figure 2.10 : Présentation schématique d'un complexe d'inclusion Amylose (simple hélice)-Acide gras, où la tête polaire se retrouve située à l'extérieur de l'hélice tandis que la chaîne aliphatique se retrouve incluse à l'intérieur de l'hélice (*d'après Putseys et al., 2010*).

CHAPITRE III

LA GÉLATINE ET L'ENCAPSULATION DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

3.1 La gélatine

3.1.1 Origine de la gélatine

La gélatine, un produit de consommation courante, est utilisée, aussi bien dans l'industrie alimentaire que dans l'industrie pharmaceutique, ou encore dans la photographie. Ce type de protéine soluble est obtenu par dénaturation (hydrolyse partielle) d'une protéine fibreuse, le collagène, constituant majeur de la matrice extracellulaire des os, cartilages et des peaux. Par conséquent, la source, l'âge de l'animal ainsi que le type de collagène influencent les propriétés de la gélatine (Johnston-Banks, 1990).

La structure de base du collagène est le tropocolagène, qui est constitué de trois chaînes α en hélice, arrangées en parallèle et enroulées entre elles pour donner une structure en triple hélice stabilisée par des ponts hydrogènes. Cette structure est le produit d'une répétition quasi-continue de la séquence Gly-X-Y, où X est la proline (Pro) et Y est l'hydroxy-proline (Hyp) (Asghar et Henrickson, 1982).

Le processus de fabrication industrielle de la gélatine consiste à contrôler l'hydrolyse du collagène et de produire une substance soluble avec des propriétés physico-chimiques souhaitées (force de gelée, viscosité et point isoélectrique). Ce processus se déroule selon les étapes suivantes :

1. **Lavage** : La matière première (ex : os) est lavée afin d'éliminer les impuretés, par dégraissage et déminéralisation. La déminéralisation des os élimine le contenu minéral (hydroxyapatite). Le lavage élimine avec le produit de l'oséine (matière organique élastique).
2. **Prétraitement** : Ce procédé a pour objectif de convertir le collagène en une forme plus appropriée à l'extraction. Durant cette étape, les liens covalents du collagène sont rompus, permettant ainsi la libération de ses chaînes- α . Ce processus sert également à éliminer les impuretés tels que les protéoglycanes, sang et carbohydrates. Le degré de réticulation du collagène détermine le processus de prétraitement nécessaire à la fabrication de la gélatine. Deux procédés de prétraitement existent : i) le prétraitement acide, principalement utilisé en industrie alimentaire, convient à des matériaux peu réticulés comme le collagène de peau de porc. Ce prétraitement conduit à la réorganisation physique de la structure du collagène, et ii) le prétraitement alcalin, utilisé pour des collagènes plus complexes provenant des os ou peaux de bovins, engendre des modifications chimiques importantes principalement, l'augmentation du nombre de carboxyles libres par transformation (désamination) des résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique (Clarck et Ross-Murphy, 1987).
3. **Extraction** : Cette étape est conçue pour obtenir un rendement maximal en optimisant l'équilibre entre pH, température et temps d'extraction. Ainsi la gélatine est obtenue en trois ou quatre étapes d'extraction séparées, en

variant la température. La première extraction est réalisée à 55°C, la deuxième à 60°C, puis à 70°C et enfin à 80-90°C pour la dernière. La force de gélification, la viscosité et la coloration de la gélatine dépendent de la température d'extraction. À chaque extraction, la force du gel ainsi que la viscosité baisse contrairement à la coloration qui augmente.

4. Purification : Après l'extraction, où la gélatine est filtrée afin d'éliminer les matières insolubles en suspension telles que les graisses ou les fibres de collagène. La gélatine est en outre purifiée par déionisation qui élimine à la fois les sels inorganiques et ajuste le pH. La gélatine commerciale est vendue à un pH entre 5,0 à 5,8.
5. Concentration : La dernière étape repose sur la stérilisation UHT (*Ultra High Temperature*) à 140°C, l'évaporation de l'eau et le séchage de la gélatine à l'aide de séchoir à air filtré. Ces étapes sont effectuées le plus rapidement possible afin de minimiser la perte de propriétés attendues.

3.1.2 La structure de la gélatine

En fonction de l'origine de la matière première et du type de prétraitement, la dénaturation du collagène (tropocollagène) en gélatine peut produire trois types de molécules. Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, les chaînes β issues de l'assemblage des deux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et la chaîne γ : oligomère de trois chaînes α (Figure 3.1).

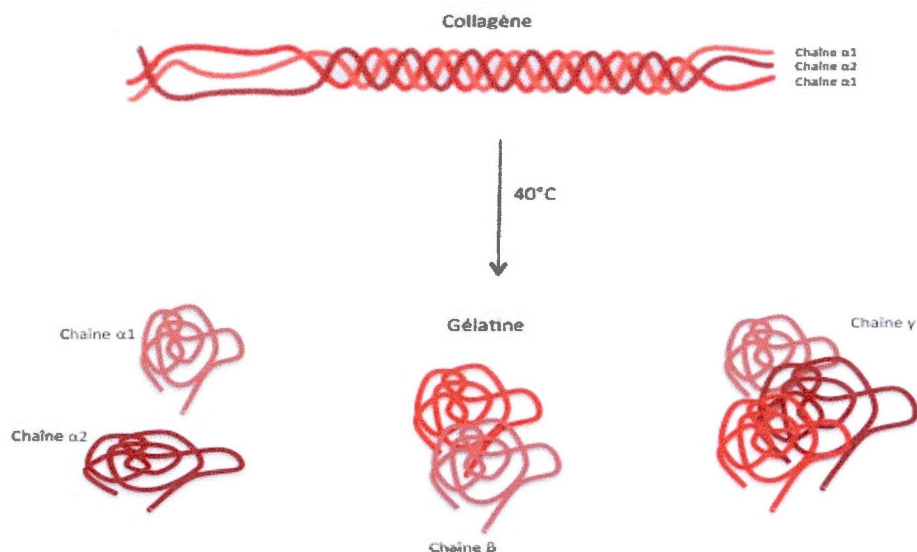


Figure 3.1: Produits de dégradation du collagène (*d'après Rose et al., 1987*).

3.1.3 Propriétés physico-chimiques de la gélatine

La qualité de gélatine utilisée pour des applications particulières dépend de ses propriétés rhéologiques. Des propriétés physico-chimiques de base, telles que la couleur, la transparence, l'odeur et le goût sont principalement déterminées par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, par sa distribution de masses moléculaires de la protéine, ainsi que par les conditions de traitement (Gómez-Guillén, et al., 2002b). Les principales caractéristiques qui définissent, le mieux, la qualité commerciale d'une gélatine sont: i) la force du gel et ii) la stabilité thermique (propriétés gélifiantes).

- i) La force de gelée, appelée aussi résistance du gel à la pénétration, est liée à l'élasticité mécanique du gel de gélatine. Sa mesure, pour des raisons de standardisation, est déterminée par le test « Bloom ». Il consiste à

mesurer la force nécessaire pour introduire un piston (de 12.7 mm de diamètre) dans un gel de gélatine (de concentration 6.67%) d'une profondeur de 4 mm. Le gel doit être gardé préalablement 17h à 10°C (Choi et Regenstein, 2000).

- ii) Les propriétés associées à la gélification sont principalement la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant. Ces propriétés sont reliées principalement à la viscosité, à la structure, à la masse moléculaire et à la température du système.

3.1.3.1 La gélatine en solution

La gélatine se présente sous forme de grains, s'hydrate et gonfle au contact avec de l'eau froide. Pour être solubilisée, la gélatine doit être chauffée à des températures supérieures à celle de la fusion des gels, c'est-à-dire à plus de 40°C. Ainsi, la gélatine en solution se trouve enroulée au hasard (*random coil*) sous forme de pelote statique avec un mélange contenant des chaînes α , β et γ (Bigi et al., 2004). En refroidissant la solution de gélatine, le phénomène de gélification se met en place. La gélification se traduit par la transition conformationnelle, avec le passage d'un état désordonné (pelote) vers un état ordonné (hélice gauche). Ce phénomène se traduisant par la renaturation partielle des triples hélices du collagène, stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les acides iminés (Pro et Hyp) et les groupes C-H, dépend de la vitesse de refroidissement (Djabourov et al., 1992, Gómez-Guillén et al., 2002b). La formation de gels de gélatine est thermoréversible et le procédé peut être répété plusieurs fois.

3.1.3.2 Propriétés de surface

Les propriétés de surface de la gélatine sont basées sur la présence de groupements chargés sur les chaînes latérales de la gélatine. Ainsi, certaines parties de sa séquence contiennent des résidus constitués d'acides aminés hydrophiles et moins polaires qui s'associent en résidus hydrophobes. Les deux parties hydrophiles et hydrophobes ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse (Schrieber et Gareis, 2007). Cette propriété multifonctionnelle de la gélatine est utilisée dans la production et la stabilisation des émulsions.

La gélatine présente des propriétés moussantes résultant de son aptitude à réduire la tension superficielle à l'interface air/eau par l'augmentation de la viscosité (Karim et Bhat, 2008). Cette propriété dépend dans une large mesure des caractéristiques de la matière première. En se déroulant et en exposant les régions hydrophobes à l'interface air/eau, la gélatine contribue à la formation et à la stabilisation des mousses (Townsend et Nakai, 1983).

3.1.3.3 Propriétés filmogènes

La gélatine a largement été étudiée pour sa capacité filmogène et son utilisation comme film externe biodégradable afin de protéger les aliments du dessèchement, de l'exposition à la lumière et à l'oxygène (Arvanitoyannis, 2002). La composition en acides aminés ainsi que la distribution en poids moléculaire sont les principaux facteurs qui influent sur les propriétés physiques et structurales de la gélatine mais elles peuvent également jouer un rôle clé dans les propriétés de barrière mécanique conférées par le film de gélatine. Les poids

moléculaires des fractions constituant la gélatine conditionnent la déformation et la plasticité du film généré. Ainsi plus le poids moléculaire de la gélatine est faible plus le film produit est déformable (Thomazine, Carvalho, Sobral, 2005).

Les propriétés physiques des films de gélatine dépendent des propriétés du matériel dont elle est issue, du procédé de fabrication de la gélatine et des paramètres de production des films eux-mêmes (température et durée de séchage). Elles dépendent également de la formulation avec des ingrédients tels que les liants et les plastifiants (sorbitol, glycérol). Les films peuvent être obtenus soit par coulage ou par extrusion. Le coulage implique de dissoudre le polymère et de le mélanger avec des plastifiants et/ou autres additifs pour obtenir une solution permettant le dépôt d'un film sur une plaque, puis une évaporation du solvant. L'extrusion d'un film est suivie d'un pressage à chaud à des températures supérieures à 80°C. Ce procédé peut affecter les propriétés du film mais a l'avantage d'être un procédé continu et contrôlable en ligne.

La forte nature hygroscopique des films de gélatine est le principal inconvénient à leur utilisation comme barrière protectrice car ils ont tendance à gonfler et à se dissoudre au contact d'aliments à haute teneur en humidité. Une haute teneur de la gélatine en acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes peut diminuer la perméabilité du film de gélatine à la vapeur d'eau (Limpisophon et al., 2009). Les propriétés des films de gélatine peuvent être améliorées par l'addition de différents bio-polymères (protéines ou polysaccharides) ou de lipides. Ainsi, les films composites contenant de la gélatine et des isolats de protéines de soja présentent à la fois les propriétés des films de gélatine (déformation) et celles des films de soja (faible perméabilité à la vapeur). Des mélanges faisant intervenir des huiles ou des cires, peuvent augmenter le nombre de groupements hydrophobes du produit, diminuant de cette façon la perméabilité à la vapeur et la solubilité du film. Il existe deux méthodes pour

ajouter de l'huile dans la composition d'un film : par émulsification de la solution filmogène ou en produisant un film double couche (Gómez-Guillén et al., 2009). L'utilisation d'inducteurs de liaisons chimiques tels que la transglutaminase (Gómez-Guillén et al., 2001) a également été citée dans la production de films de gélatine. Son utilisation modifie la résistance des films à l'élongation et leur perméabilité à l'oxygène. Les modifications induites respectivement par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide et la transglutaminase entraînent une diminution de la solubilité des gels de gélatine dans l'eau.

Le film de gélatine est l'un des premiers matériaux à avoir été utilisé pour la fabrication de films bioactifs (Mchugh et al., 1994). L'enrichissement des films de gélatine par des agents antioxydants tels que des polyphénols issus d'extraits de végétaux (exemple : origan, romarin) ou encore d'agents antimicrobiens augmente leurs intérêt (Gómez-Estaca et al., 2009a and Gómez-Estaca et al., 2009b). Ces études ont montré que la combinaison d'agents antioxydants avec les films de gélatine diminuait leurs forces de rupture et de déformation.

Le pouvoir filmogène de la gélatine est une propriété importante dans l'industrie pharmaceutique notamment dans la fabrication de capsules. Un mélange de gélatine de différents types et origines est utilisé dans la formulation des capsules afin d'obtenir des propriétés bien spécifiques (force de gelée, viscosité, etc.). Des tests de pharmacopées, notamment des tests de dissolution et de désagréation, ont mis en évidence des problèmes liés à la solubilité des capsules. En effet, des conditions de conservation à des températures et humidités élevées, et/ou la présence de composés réactifs (aldéhydes) issus de l'auto-oxydation de lipides ou d'excipients, provoquent un phénomène de réticulation de la gélatine (Meyer et al., 2000 ; Chafetz et al., 1984). Ce phénomène induit la formation d'une pellicule insoluble autour de l'enveloppe de la capsule limitant la libération de la substance active contenue à l'intérieur

(Carstensen et Rhodes, 1993). La présence d'aldéhydes mène à une augmentation du poids moléculaire de la gélatine par création de liaisons intermoléculaires de types amides, ce qui réduit considérablement, voire empêche, la dissolution de la gélatine (Yannas, 1972; Mwangi et Ofner, 1995).

3.2 L'encapsulation

L'encapsulation est une technique qui consiste à retenir des agents actifs ou des molécules bioactives (antioxydants, acides gras, vitamines, etc) au sein d'un matériau jusqu'à leur livraison et éventuellement leur libération. Les matériaux utilisés pour la conception de la couche externe de protection doivent être de préférence biocompatibles, biodégradables et capables de former une barrière entre la phase interne et ses environs.

Les polysaccharides sont les plus largement utilisés dans le domaine alimentaire ou encore pharmaceutique. On peut citer l'amidon et ses dérivés; dextrine, maltodextrine, polydextrose. Les extraits de plante comme la gomme arabique, la gomme adragante (exsudat issu de sève mucilagineuse), la pectine, polysaccharide de soja ou encore les polysaccharides d'origine animale tels que le chitosane et le xanthane sont également utilisés. En dehors des polysaccharides naturels ou modifiés, les protéines et les lipides comme les cires, les glycérides ou encore les phospholipides sont également appropriés pour l'encapsulation (Nedovic et al., 2011).

Les caractéristiques physico-chimiques de chaque matériau déterminent la réussite de son utilisation. Ainsi, il est indispensable d'étudier et d'analyser toutes les propriétés du matériau afin de conclure et de prédire son comportement dans les conditions de formulations alimentaires ou

pharmaceutiques (Nedovic et al., 2011).

3.2.1 Techniques d'encapsulation

3.2.1.1 Liposomes et les molécules tensioactives

Les liposomes sont des candidats naturels pour l'encapsulation de substances hydrophobes. Leurs structures amphiphiles leur confèrent la capacité de s'organiser aux interfaces.

Différentes architectures de tensioactifs ont été développées dans le but d'essayer de mimer les molécules amphiphiles naturelles. C'est le cas des amphiphiles bicaténaires qui reproduisent la structure constitutive des membranes biologiques (Nakashima et al., 1997). Ces tensioactifs synthétiques sont constitués d'une tête polaire reliée à deux queues hydrophobes. Ils ont été utilisés pour former des vésicules sphériques ou des liposomes (Figure 3.2). Ces derniers s'organisent en bicouche lipidique concentrique.

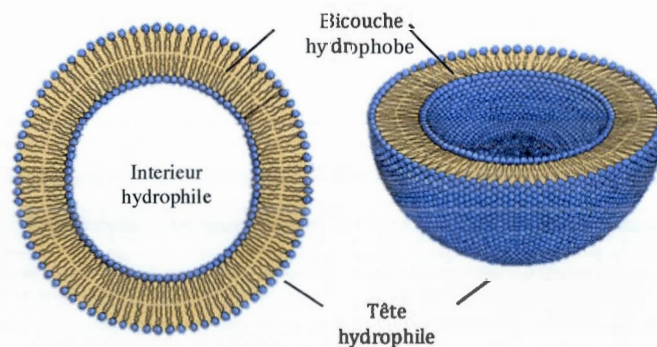


Figure 3.2: Structure schématisée d'un liposome.

L'encapsulation par liposome est très utilisée en pharmaceutique et en cosmétique où les quantités de matière active sont modérées (Fuhrhopet Mathieu, 1984).

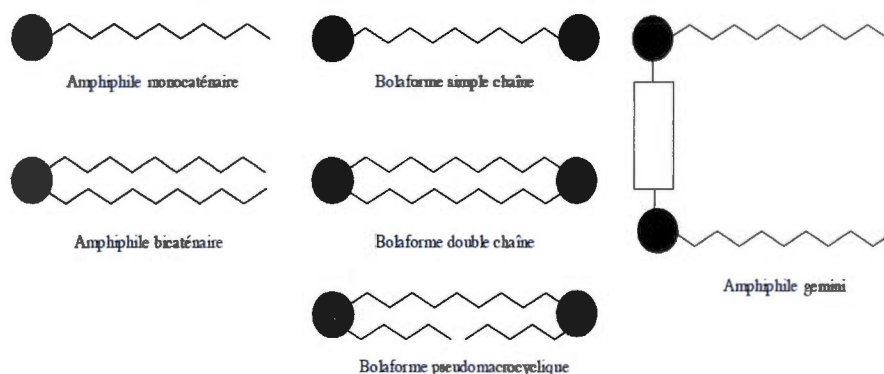


Figure 3.3: Différentes architectures d'amphiphiles synthétiques.

Il existe des tensioactifs bipolaires amphiphiles couramment appelés bolaformes ou encore bola-amphiphiles (Prata et al., 1999). Ils sont caractérisés par la présence de deux têtes polaires identiques ou non, espacées par une ou deux chaînes aliphatiques (Figure 3.3).

Les plus importantes sources de bola-amphiphiles sont les lipides naturels constituant les membranes biologiques des archaebactéries. L'organisation en monocouches très résistantes de ces bolaformes, confère à ces organismes la particularité de survivre et de pouvoir proliférer dans des conditions extrêmes de salinité, de température et de pH. Ces structures ont trouvé plusieurs applications potentielles notamment pour la perméabilisation des membranes via un mécanisme d'insertion où le bras espaceur des molécules bolaformes a la capacité de s'incorporer dans la membrane lipidique en formant un U, qui induit

une déstabilisation, voire la rupture de la bicouche membranaire (Nagawa, 1991).

3.2.1.2 L'émulsion

Il est possible d'encapsuler diverses substances actives de nature hydrophobe en utilisant la voie de l'émulsion. Les émulsions sont des systèmes hétérogènes composés d'au moins deux liquides non miscibles ou faiblement miscibles, comme l'eau et l'huile. L'encapsulation de molécules actives (Gibbs et al., 1999) peut se réaliser par une émulsion de type huile/eau (H/E) ou encore eau/huile/eau (E/H/E) (Figure 3.4).

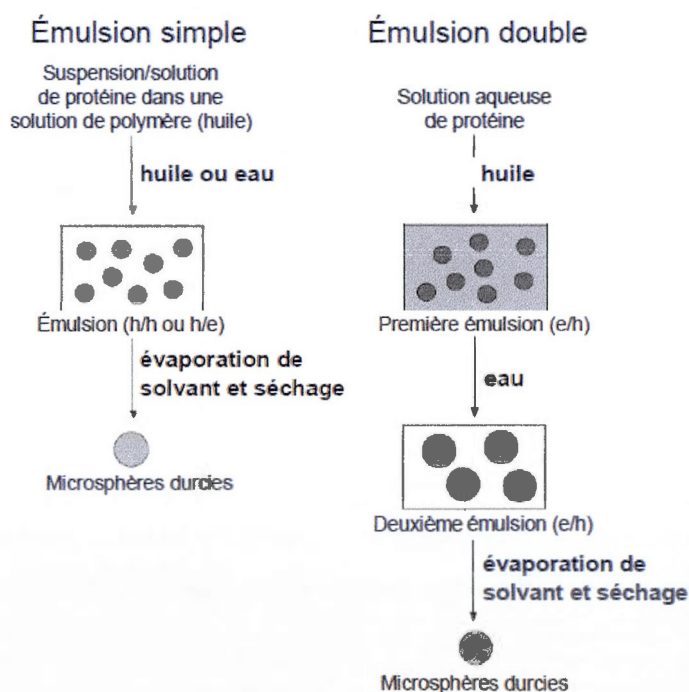


Figure 3.4: Technique d'émulsion du principe actif (exemple:protéines) par émulsion simple (gauche) ou émulsion double (droite).

- Émulsion simple (H/E)

Dans cette méthode, le principe actif est placé dans une phase dispersée, qui est une solution de polymères dans un solvant organique pour la préparation de composés relargants. La cinétique de relargage peut être contrôlée en choisissant la masse molaire et/ou la proportion du polymère. La solution du principe actif est par la suite ajoutée dans une phase continue, pouvant être une solution aqueuse (H/E) contenant un tensioactif. La présence de tensioactifs stabilise l'émulsion. L'étape d'émulsification peut être effectuée par agitation intense, homogénéisation ou par sonication.

À l'issue de cette étape, le solvant organique est éliminé par évaporation ou par extraction. Au cours du processus d'évaporation, l'émulsion durcit lorsque le solvant organique de la phase dispersée passe dans la phase continue et s'évapore. Dans le cas du processus d'extraction, plus rapide que l'évaporation, l'émulsion est transférée dans une grande quantité de milieu aqueux ou organique. Les microsphères issues par extraction sont plus poreuses que celles produites par évaporation. Ces microsphères sont récupérées par filtration ou centrifugation.

- Émulsion double (E/H/E)

Dans ce cas, la solution aqueuse contenant la molécule active est d'abord émulsionnée dans un solvant organique contenant le polymère. Ensuite, l'émulsion E/H est ajoutée dans une phase aqueuse contenant un tensioactif, formant ainsi l'émulsion E/H/E. L'élimination du solvant organique est réalisée de la même façon que dans l'émulsion simple, c'est-à-dire par évaporation ou

par extraction. Une des limites de ces techniques est le recours au solvant organique, souvent toxique.

3.2.1.3 Nébulisation ou «spray drying»

La nébulisation (Murugesanet Orsat, 2012) est la plus ancienne technique d'encapsulation dans le secteur pharmaceutique. Ce procédé repose sur le séchage d'une formulation liquide, contenant un polymère et un principe actif, pour être convertie en microparticules. En premier lieu, le polymère hydrophobe ou hydrophile est dissout dans un solvant. La substance active est dissoute ou mise en suspension dans ce même solvant. Le mélange homogène obtenu est pulvérisé à travers une buse d'atomisation conduisant à la formation des aérosols. Ceux-ci sont mis au contact d'un flux d'air chaud permettant l'évaporation du solvant initial et la formation de microsphères ou de microcapsules. La taille des particules obtenue n'excède pas 40 μm .

La géométrie de la buse ainsi que la viscosité de la solution de départ sont des paramètres influençant l'encapsulation. Une perte de produit peut se produire due à l'adhésion des particules sur la paroi de l'appareil.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

L'amidon est un produit d'origine naturelle, présentant un intérêt d'ordre économique dû à son faible coût et un intérêt écologique (biodégradabilité). En dehors des aspects importants dans le domaine alimentaire, son utilisation n'a jamais cessé de croître notamment dans le domaine pharmaceutique où il est utilisé comme excipient.

L'équipe de recherche du professeur Mateescu a introduit, dans les années 90, le Contramid®, une matrice à libération contrôlée, à base d'amidon riche en amylose réticulé (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991; Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1991). Cet excipient possédant un taux bas de réticulation a été utilisé pour la libération lente de certains principes actifs. Une autre forme à base d'amidon à haut degré de réticulation, enregistré sous le nom commercial Liamid®, a été proposée comme agent liant et désintégrant (Cartilier et al., 1997; Dumoulin et al., 1994). Cet excipient a montré des propriétés liantes lors de la compression de la formulation et désintégrant au contact des fluides digestifs permettant une libération rapide du principe actif.

Un nouvel excipient novateur, obtenu quelques années plus tard, par l'introduction de fonctions carboxyliques sur l'amidon riche en amylose non réticulé, a été proposé en 2004 comme excipient pour la livraison de substances actives au niveau du tractus intestinal (Mulhbach, Mateescu et Calinescu, 2004; Calinescu et al., 2005, Calinescu et al., 2007). Le carboxyméthylamidon est un matériau polymérique hydrophile qui peut assurer l'intégrité de l'agent actif durant son passage au niveau gastrique dû à la formulation d'une couche d'hydrolyse générant ainsi son insolubilité à pH acide.

Dans le but de limiter les interactions ioniques entre la matrice et le principe actif pouvant contrôler sa libération, un nouvel excipient pH-indépendant résultant de la complexation du CMA et de la lécithine (phospholipide) a été élaboré par Friciuet al., (2013) par l'inclusion de la lécithine (diglycéride) à l'intérieur de l'hélice V du CMA. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les oméga-3 sous forme de di- et triglycérides pourraient être immobilisés et stabilisés, de façon similaire, dans le CMA.

Les oméga-3, naturellement présents sous forme mono-, di- et triglycérides (principalement) souvent doivent subir une transformation industrielle en deux étapes avant commercialisation: la saponification et la transestérification des AG libres (générés par saponification) avec de l'éthanol (Mogelson et al., 1984; Saghir et al., 1997). Ce procédé de transestérification génère des esters éthyliques d'acide gras (EEAG).

Les formes commerciales d'huile oméga-3 à administration orale se limitent à des gélules. Ces dernières présentent certaines limitations:

- i) difficulté d'absorption due à la libération du contenu de la gélule et à la flottaison de l'huile à la surface du milieu gastrique, d'où des symptômes

d'éruptions avec un arrière-goût de poisson, brûlures d'estomac, mauvaise haleine, des flatulences et de la diarrhée (Fetterman et Zdanowicz, 2009)

ii) instabilité face à la lumière et à la température élevée (oxydation).

Dans ce contexte, nous nous sommes orientés vers des formes monolithiques des huiles oméga-3 soupçonnées de présenter une meilleure stabilité et un transit gastro-intestinal plus approprié à ce type d'agents naturels.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de réaliser une forme orale de l'huile oméga-3 sous forme solide de type: comprimés monolithiques. Cet objectif principal peut être articulé sous forme de plusieurs objectifs pour les diverses étapes parcourues dans la réalisation du projet. Ces objectifs partiels étaient:

- L'élaboration et préparation d'un complexe contenant de l'huile oméga-3 sous une forme monolithique par séchage type spray drying (nébulisation);
- La réalisation d'un type de comprimé monolithique non flottable contenant de l'huile oméga-3, permettant une meilleure biodisponibilité et une meilleure stabilité face à la dégradation aux UV;
- L'évaluation du profil de dissolution de l'huile oméga-3;
- L'évaluation du pouvoir antioxydant du complexe sous la forme de comprimé;
- L'investigation de la structure du complexe à l'aide du test d'iode, analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR), diffraction de rayons X (DRX);

- L'élaboration d'un modèle structural hypothétique pour le complexe CMA-omega3/G.

Des tentatives de compression directe de poudre obtenue par spray drying de la suspension de CMA complexé avec l'huile oméga-3 ont permis l'obtention des comprimés, mais avec une perte en huile. Pour ces raisons nous avons tenté l'utilisation du complexe CMA/lécithine. Ce complexe élaboré selon Friciu et al, (2013) montrait un caractère hydrophobe intéressant pour l'ajout de l'huile oméga-3. Les résultats ont été améliorés, mais une perte d'huile a persisté à la compression. Ainsi, nous nous sommes orientés vers une nouvelle formulation, toujours basée sur une suspension de CMA, préalablement complexé avec de l'huile oméga-3, à laquelle on a ajouté de la gélatine.

Ce complexe a été séché par nébulisation, ce qui a généré une poudre permettant la formation de comprimés avec des propriétés mécaniques adéquates. Ces caractéristiques ont été étudiées afin d'évaluer la stabilité de l'huile oméga-3 dans cette nouvelle formulation et aussi établir la capacité des comprimés à libérer de l'huile oméga-3 dans le fluide intestinal simulé (SIF), après un passage dans le fluide gastrique simulé (SGF).

L'avancement du projet peut être suivi, selon le schéma suivant :

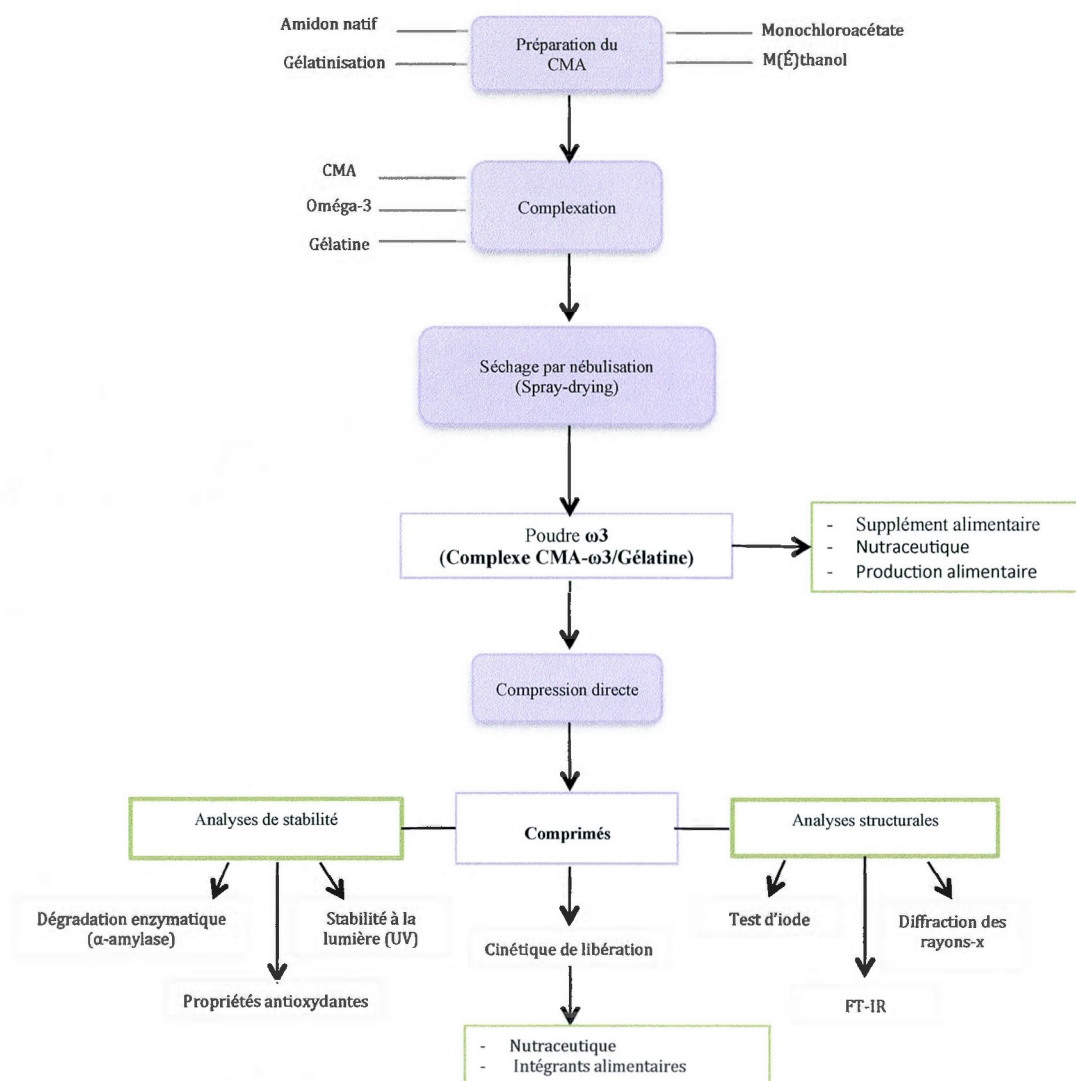


Figure 4.1: Présentation schématique des différents étapes du projet de maîtrise.

SECTION II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

COMPLEXES EN FORME SOLIDE DES HUILES OMÉGA-3 AVEC DU
CARBOXYMÉTHYL AMIDON: POUDRES ET COMPRIMÉS MONOLITHIQUES

5.1 Complexes en forme solide des huiles oméga-3 avec du carboxyméthyl amidon: poudres et comprimés monolithiques

Nassima Larbi, Canh Tien Le et Mircea Alexandru Mateescu*

Département de Chimie, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada

Les formes actuelles des suppléments d'oméga-3 (gélules) présentent plusieurs inconvénients: le coût élevé, l'oxydation de l'huile omega3 à l'air et à la lumière, ou encore à la faible biodisponibilité pour l'absorption intestinale. Dans cette étude, une nouvelle formulation de l'huile oméga-3 conditionnée sous forme de poudre avec le carboxyméthyl amidon (CMA) et la gélatine permet la production de comprimés par compaction directe. Cette nouvelle forme de comprimés monolithiques protègent les omega3 de l'oxydation et augmente leur biodisponibilité. Les analyses structurales (test d'iode, FT-IR et X-ray) soutiennent l'hypothèse de la formation d'un complexe, où le CMA agit comme une matrice des omega3 et aussi comme un stabilisant thermique pour la gélatine, qui à son tour agit comme un assembleur du complexe CMA-omega3 via des interactions polaires. Cette nouvelle formulation permet d'élargir le champ d'application des oméga-3 vers les industries agroalimentaire, nutraceutique et pharmaceutique.

* Contribution de l'auteur et des co-auteurs

Nassima Larbi - expérimentation, rédaction, figures, recherche bibliographique

Canh Tien Le - supervision du projet, rédaction

Mircea AlexandruMateescu - supervision du projet, révision des manuscrits

Article en préparation de soumission

**Omega3 complexes with carboxymethyl starch, stabilized with gelatin, for
solid forms: powder and monolithic tablets**

Nassima Larbi, Canh Tien Le and Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry and Centre Pharmaqam,
Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Branch A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

*Corresponding author

Phone : 1 (514) 987 4319

Facs : 1 (514) 987 4054

e-mail : mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

Omega3 (ω 3), a food supplement currently commercialized under form of soft gelatin capsules, presents several inconvenients related to high production cost, oxidation of liquid omega3 due to light and oxygen exposure and low bioavailability for absorption. This report proposes a new form of omega3 oil obtained by complexation with Carboxymethyl starch (CMS) and gelatin conditioned as dry powder allowing production of tablets by direct compression. This novel monolithic tablet form prevents omega3 oxidation and is able to increase its bioavailability. Structural analysis (Iodine test, FT-IR, X-ray) supports the hypothesis of an inclusion complex of omega3 into CMS matrix. The CMS acts also as a thermal stabilizer for gelatin, which, in turn, stabilizes the CMS-omega3 complex assembled via polar interaction. This novel formulation allows to extend the field of application of omega3 to food, nutraceutical and pharmaceutical industries.

Keywords : Carboxymethyl starch, Omega3, Gelatin, Inclusion complex, Powder, Monolithic tablets, Intestinal delivery

1. INTRODUCTION

Omega3 (ω 3) fatty acids are essential polyunsaturated fatty acids (PUFA) that cannot be synthesized by the human body. They are mostly provided by alimentation. However, in certain conditions, the uptake does not reach the daily-recommended level and omega3 supplements are frequently needed. Their intake through diet or supplementation is required particularly in various conditions such as post-surgery recovery, intestinal malabsorption syndromes or in metabolic disorders. The interest in omega3 polyunsaturated fatty acids (i.e. eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) as dietary supplements is continuously growing due to their essential role in human health. It was found that omega3 supplement is beneficial, especially in cardiovascular diseases and several immune system disorders (Shahidi et Miraliakbari, 2004, 2005).

The omega3 naturally occur mainly as triglyceride (TG) but are commercially marketed under ethyl esters (EE) of free fatty acids that are semi-synthetic forms. Production of EE involves trans-esterification of omega3 with ethanol (Mogelson, Pieper et Lange, 1984). The digestion of EE generates free fatty acids and ethanol, which can cause some side effects on children or people with deficient alcohol dehydrogenase (Yang, Kuksis et Myher, 1990a). Furthermore, the fatty acid-ethyl ester is up to 50 times more resistant to pancreatic lipase compared to lipolysis of natural omega3 under TG form (Yang, Kuksis et Myher, 1990a; Yang et al., 1990b). Generally, commercial omega3 liquid encapsuled in soft-gel enteric coating remains stable in simulated gastric fluid (SGF). However, this dosage form presents inconvenients such as eructation with fishy aftertaste (Fetterman et Zdanowicz, 2009) probably due to a longer residence time of the capsule in stomach (floating phenomenon). During this longer gastric floating, the omega3 can be released remaing at the gastric fluid surface. Several alternatives were proposed, such as to use chitosan-whey protein as matrix to

encapsulate omega3 (Duan, Jiang et Zhao, 2011). A good protection was observed with these capsules. However, chitosan is not yet approved by Food and Drug Administration (FDA) as GRAS (Generally Recognized As Safe). Food enrichment with omega3 constitutes also an alternative. Unfortunately, omega3 are generally difficult to disperse in food products due to the in hydrophobic and organoleptic properties. In addition, omega3 are unstable and susceptible to auto-oxidation in the presence of light and oxygen, often resulting in the formation of a variety of toxic degradation products. Some of these products are aldehydes (i.e. malondialdehyde) that have an unpleasant smell and taste, leading to off-flavors in such food fortified with omega3. For these reasons, it is of interest to (micro)encapsulate omega3 using a coating material as barrier to oxidation, thereby masking undesired off-flavors. Although both synthetic and natural polymers can be used as coating materials, only GRAS materials can be used for microencapsulation, in food and drug technologies (Jin et al., 2007).

There are several methods of omega3 microencapsulation including spray dried emulsions or spray dried complex coacervates. The bioavailability of omega3 micro-encapsulated by spray-dried emulsions has been shown to be high in animal and human studies (Wallace et al., 2000; Yep et al., 2002). However, this method tends to have high oil levels at the surface, a low omega3 content inside the preparation, and poor stability, limiting commercialization of these forms.

The aim of this report is to propose a new formulation based on a novel omega3 complex with carboxymethyl starch (CMS) in powder form allowing to obtain monolithic tablet devices. This solid form of omega3 is totally different to previous standard liquid forms and presents several advantages such as the possibility to add directly omega3 powders in food processing (milk, meat, cake, etc.) or to directly compress omega3 powder to generate monolithic tablets. This CMS matrix is mechanically stable and is expected to limit some gastric

disagreements and reduce fish smell by decreasing the gastric residence time and favoring thus the release of omega3 in the intestinal tract (main absorption site). It is also hypothesized that CMS matrix will afford a certain protection of omega3 sensitive to light and oxygen damage. The CMS was recently proposed as novel excipient for colon targeted delivery of Diamine oxidase (Calinescu et Mateescu, 2012), of probiotic bacteria (Calinescu et al., 2008) and of mesalamine under monolithic tablet forms (Friciu et al., 2013).

2. MATERIALS AND METHODES

2.1. Materials

High amylose starch (Hylon VII) was supplied by National Starch (Bridgewater, NJ, USA). The omega3 fish oil (different fatty acids under mono-, di- and triglyceride forms) was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) and commercial omega3 soft-gel capsules (mainly EE fatty acid form) were from Renew Life (Oakville, ON, Canada). Simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) were prepared according to USP (United States Pharmacopeia, XXIV, 2000). Gelatin type B was purchased from Fisher Scientific (NEPEAN, ON, Canada). The other reagents were chemical grade and used without further purification.

2.2 Carboxymethyl Starch-omega3/Gelatin complex

2.2.1 Synthesis of sodium Carboxymethyl-Starch

The Carboxymethyl starch (CMS) was prepared by etherification of high amylose starch with sodium monochloroacetate, according to Assaad and Mateescu,

2010. The synthesis was operated in a jacketed beaker (2L) at 55°C using a heating circulator bath. An amount of 140 g of starch was hydrated in 340 mL of distilled water under continuous vertical stirring (Servodyne Mixer, 50000-40, IL, USA). To gelatinize the starch, 470 mL of 1.5 M NaOH were added under stirring and maintained for 30 min. Then, an amount of 70 g sodium monochloroacetate solubilized in a minimal water volume was immediately added, continuing the stirring for 1 h reaction. Finally, a volume of 540 mL of distilled water was added to the reaction mixture which was thus cooled down and then neutralized (pH 6.8). The CMS powder was obtained by precipitation with an excess of methanol or ethanol, dried at 40°C overnight and sieved retaining particles less than 300 µm. The degree of substitution (DS) of CMS was about 0.18 determined by back-titration (Assaad et Mateescu, 2010). The obtained DS (0.18) corresponds to 1.05 milliequivalents (mEq/g) of functional groups per gram of polymeric powder.

2.2.2 Preparation of Carboxymethyl-Starch-omega3/Gelatin (CMS-omega3/G) complexes

CMS was used as matrix for immobilization of omega3 at 1:1 (w/w) ratio. A quantity of 20 g of omega3 oil was added to 20 g of CMS powder or to native starch (used as control) powder and mixed for homogenization to obtain a powder of CMS impregnated (complexed) with omega3. The obtained CMS-omega3 (or native starch-omega3) complex was then added to 1 L gelatin (G) solution (0.5 %) in water under stirring at 60°C to obtain a homogenous suspension. The CMS-omega3/G complex was then dried using a laboratory spray dryer B-290 (Büchi, Zurich, Switzerland) under the following parameters: inlet temperature 100°C, outlet temperature 50°C, spray rate 10 mL/min,

aspirator setting 38 m³/h and nozzle setting at 1 mm. During the drying process, the solution of polymeric complex was always kept under mild stirring to avoid sedimentation of the complex. The obtained powder was used for further physico-chemical characterisation and for tablet preparation.

2.3 Powder compression to obtain monolithic tablets and evaluation of bioactive agent loading

Monolithic tablets (300 mg) containing CMS-omega3/G were obtained by direct compression of the spray-dried powder of the complex. Three tablet types were obtained at various compression forces of 0.5, 1.0 or 2.0 T/cm² in 9.0 mm cylinder outfits with flat-faced punches, using a manual hydraulic Carver press (Wabash, IN, USA). Tablets were mechanically stable when obtained at compacting force at 1.0 T/cm², and were used for all subsequent studies. The omega3 loading of tablets was determined by its extraction from 3 tablets (after fracturation) in iso-octane and the absorbency read at 230 nm with an UV OceanOptics Spectrophotometer (SD2000, Dunedin, FL, USA). Standard curve was established with different concentrations of omega3 from 0 to 100 µg/mL in iso-octane. The omega3 in tablets (300 mg) was 123 mg (41%).

2.4 Characterization of Omega3/CMS/G complexes

2.4.1 Iodine coloration test

Different compositions (native starch, native starch-omega3 inclusion complex, CMS, CMS-omega3 inclusion complex, CMS-omega3/G complex) were submitted

to the iodine test as described by Kawai et al. (2012), in order to evaluate the presence of omega3 into the helical structure of starch. Practically, a volume of 120 μL of iodine reagent (2.0 % KI and 1.0 % I_2 in distilled water) was added to each assay solution (60 mL) containing 0.5 % (w/w) of analysed sample at room temperature. Native starch was used as control. The nature and intensity of color with the iodine was indicative for the formation of various complexes.

2.4.2 Fourier transform infrared (FT-IR) analysis

The FT-IR spectra of samples as powders or as tablets were recorded (16 scans at a resolution of 2 cm^{-1}) using a Thermo-Nicolet 6700 (Madison, WI, USA) FT-IR spectrometer equipped with a deuterated triglycinesulfate-KBr (DTGS-KBr) detector and a diamond smart attenuated total reflection platform. In order to better understand omega3 inclusion in the CMS-omega3/G, a complex omega3-gelatin only (omega3-G) was obtained by spray dring and analysed by FT-IR.

2.4.3 X-ray diffractometry (XRD)

The diffraction patterns of different samples were recorded using a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) with a Cobalt cathode operating in reflectance mode at wavelength of 1.79019 \AA . The diffractograms, recorded between 5 and 50° for 2θ , were treated using a Diffracplus software.

2.5 Dissolution assay

Dissolution profiles were followed with a Distek apparatus according to USP (Apparatus 32). Tablets were each placed in 50 mL SGF (pH 1.2) during 2 h and then transferred in 50 mL of SIF (pH 6.8). The omega3 release kinetics were evaluated by withdrawal of samples at different time intervals (1, 2, 4, 6, 8 and 10 h). Aliquots of 3 mL were withdrawn from dissolution media and diluted with 3 mL of iso-octane. For each point, the mixture was centrifuged at 1000 rpm, filtered and absorbency measured in UV at 230 nm. Standard curve was established with different concentrations of omega3 from 0 to 100 µg/mL in iso-octane.

2.6 Enzymatic degradation of CMS/omega3 complexes

The assays were carried out as described by technical procedure of Sigma-Aldrich (protocols and documents 32) with slight modification as follows: CMS/omega3/G tablets (300 mg) were each incubated in 50 mL of SIF (pH 6.8 at 37°C and 100 rpm) containing 25 Units/mL of α -amylase according to USP (United States Pharmacopeia, XXII, 1999). At different intervals, samples (2 mL) were withdrawn from SIF in test tubes and 1 mL of DNS (3,5-Dinitro salicylic acid) reagent was added. After heating during 15 min, the tubes were cooled down on ice bath and 9 mL of water were added. The intensity of the orange-red color developed in the medium (due to the reduction of DNS by reducing maltose liberated by amylolysis of CMS) was spectrophotometrically measured at 540 nm.

2.7 Antioxidant and light stability test

The test consists in direct irradiation of different samples by an UV source (0.05 Kgray/h) for various times (0, 15, 30, 60 min and 5 h). Reactive oxygen species (ROS) generated by UV can oxidize omega3 and thus reduce its antioxidant activity. The protection properties afforded by CMS/G matrix were evaluated by electrolysis method according to Le Tien et al. (2001). Practically, volumes of 3 mL of omega3 samples or omega3 complexated with CMS/G or even commercial capsules were each irradiated at various intensities and then introduced in electrolysis cell and submitted to continuous current (400 Volts, 10 mA for 1 min at room temperature) using a generator (Bio-Rad, model 1000/500). Then, 1 mL of electrolyzed sample was withdrawn and introduced in 2 mL of DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) solution (25 %) and the absorbency recorded at 515 nm. The retained antioxidant capacity of omega3 was calculated accordingly to the equation:

$$\text{Scavenging (\%)} = 100 - [(\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100]$$

Where OD_{control} (Optical density of control) represents the OD of electrolyzed solution (ascribed to 0 % antioxidant capacity) and the OD_{sample} is that of the sample.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

In this study, several compositions based on starch and its derivatives such as acetylated and carboxymethylated starch were investigated with regard to their capacity to complexate omega3 oil. Gelatinized starch and cross-linked starch have been previously shown as able to include fatty acids and single chain lipids

(Buléon et al., 1998; Le Bail et al., 1999) and interesting applications in food processing were described. Liu et al. (1997), reported that acetylation decreased the complexing ability of amylose starch and neither native nor acetylated starch were able to interact adequately with triglycerides. We are now reporting data on native high amylose starch, with uncharged polar hydroxylic groups, able to complexate omega3 oil at an optimal starch:omega3 weight ratio of approximately 1:1 (w/w). With acetylated starch (increased overall hydrophobic characteristics), a behavior similar to native starch was observed. Furthermore, the present report describes a carboxymethylated starch (with negative charges) with a capacity to include omega3 twice or even more than that of native or of acetate starch. As previously shown, starch carboxymethylation generated a change of the double helix into a simple helix form (Lemieux et al., 2010) with a larger cavity and more pronounced hydrophobic disposal inside the helix-V form (Friciu et al., 2013). This V-helical form of CMS appeared more favorable to incorporate omega3, including di- and tri-glycerides, in comparison to the double helical form of native starch.

Although CMS appears suitable to include omega3, the CMS-omega3 complex was not enough resistant to the compression and some leaking of omega3 oil from tablet was often observed during the tablet manufacturing. For this reason, the addition of a stabilizer to the formulation was necessary. For the present formulation, gelatin a GRAS, low cost agent and with compatibility with fatty acids was selected as stabilizer. When gelatin was added in a concentration of 0.5 %, the CMS-omega3/G complex obtained by spray drying was mechanically stable and resistant at compression (up to 1.0 T/cm²). In addition, no melting of gelatin was observed during the spray drying process at temperatures exceeding 100 °C.

3.1 Structural analysis of CMS-omega3 complex

Various studies have described starch-fatty acid complexes (Morrison, Law et Snape, 1993; Godet et al., 1993). However, these fatty acids were mainly under free monochain fatty acid or monoglyceride forms. To the best of our knowledge, this report is the first describing an omega3 triglyceride included in a starch derivative and generating a solid form of omega3 with a starch derivative as matrix. It is assumed that fatty acid chains and di- and triglycerides are localized within the simple V-helix of CM-amylose, whereas the polar head groups probably remain outside the cavity as previously observed with other fatty materials (Putseys, Lamberts et Delcour, 2010; Friciu et al., 2013).

3.2 Iodine test

It is well known that starch and several derivatives have the capacity to include iodine inside the amylose helix cavity giving a characteristic blue color, except hydrolyzed starch, generating a deep-purple color (Fig 5.1.1). In the case of starch-lipid complex the absence of coloration was considered a proof that the fatty acids were located inside the helical cavity (Exarhopoulos et Raphaelides, 2012; Kawai et al., 2012; Friciu et al., 2013), hindering thus formation of additional iodine complexes.

Our iodine assays (Fig 5.1.1) for hydrolyzed starch and CMS controls (without complexation of omega3) deep blue-purple coloration (Fig 5.1.1) indicated the presence of iodine inside the hydrophobic cavity. The native starch-omega3 complex presented a low purple coloration (Fig 5.1.1 c) whose intensity

suggested a certain inclusion of the omega3 under monoglyceride or free fatty acid forms. The lower coloration indicated some remaining empty amylose channels still available for a limited iodine inclusion. In contrast, no color at all was noticed for the assay solutions containing CMS-omega3 or CMS-omega3/G complexes (Fig 5.1.1 e, f) suggesting that the omega3 oil under different forms including di- and tri-glycerides was incorporated in the single V-helix cavity of CMS. Thus it appears that the majority of cavities were occupied by omega3 and there was no more accessibility for the iodine complexation.

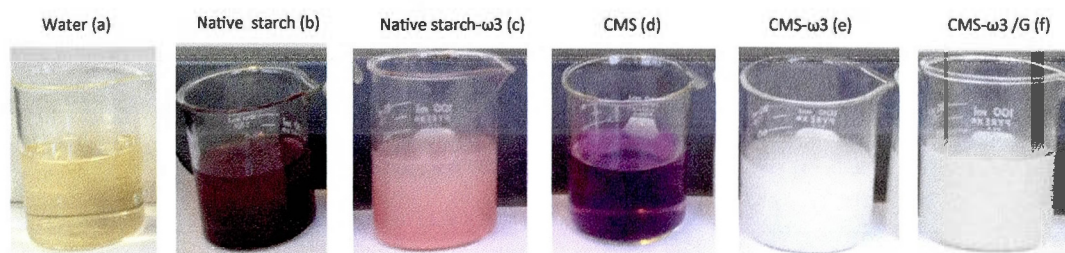


Figure 5.1.1: Iodine assays with native and carboxymethylated starch, unloaded or loaded with omega3.

3.3 FT-IR analysis of starch and CMS-omega3/G complex

FT-IR of native starch (Figure 5.1.2A) shows a characteristic band at 1640 cm^{-1} corresponding mainly to the -OH stretching vibrations, whereas for CMS new additional bands at 1590 cm^{-1} and 1417 cm^{-1} were ascribed respectively to -COO- (carboxylate groups) symmetrical and asymmetrical stretching vibrations (Žoldáková et al., 2005; Silverstein, Webster et Kiemle, 2005). The FT-IR spectrum of CMS-omega3/G complex (Figure 5.1.2B) presents bands at 1640 cm^{-1} , assigned to -OH groups of CMS overlapping with the amide-I band from gelatin and at 1525 cm^{-1} , for amide-II band (Payne et Veis, 1988).

An additional band localized at 1550 cm^{-1} was found for CMS-omega3/G complex and was ascribed to the ionic interactions between CMS and gelatin. In fact, these ionic interactions could play an important role in stabilization of CMS-omega3/G complex and explaining why the CMS-omega3/G complex is more stable than the physical mixture of CMS and omega3+G complex. No similar band at 1550 cm^{-1} was noticed for CMS mixed physically with omega3-G. Generally, when the formulation of omega3 incorporated in CMS has been stabilized with gelatin the complex was more resistant to the heating during the spray drying process and at compression during tablet manufacturing.

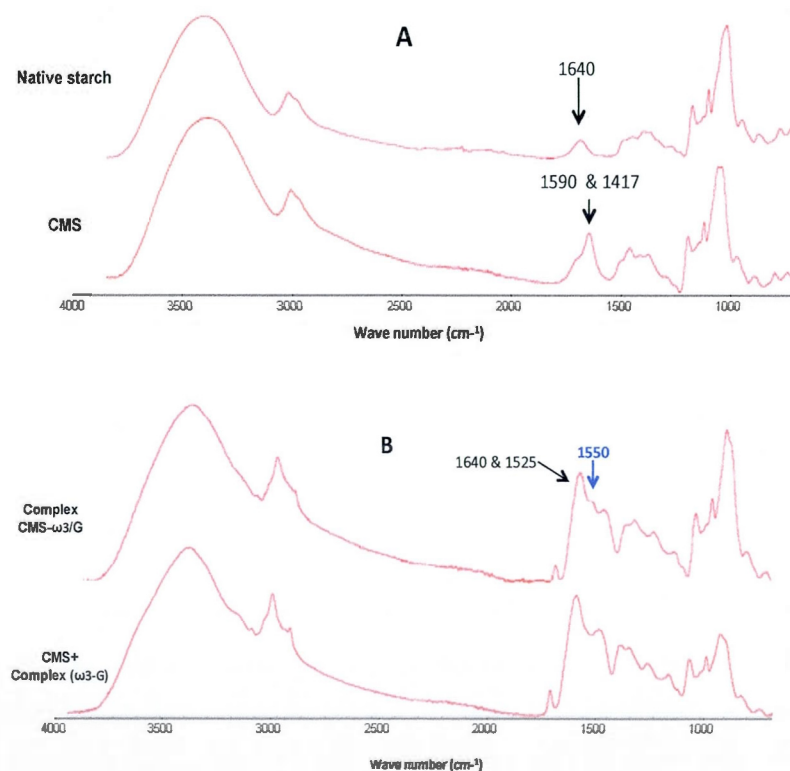


Figure 5.1.2: FT-IR spectra of native starch, and CMS powders (A) and of CMS-omega3/G complex and CMS physically mixed with omega3-G complex powders (B).

3.4 X-ray diffraction

Generally, native starch exhibits a semi-crystalline structure (Figure 5.1.3) corresponding mainly to the double helix-B form (Ispas-Szabo et al., 1999). After carboxymethylation, X-ray diffractogram showed a pronounced decrease of order degree of CMS when compared to native starch, probably due to a lower hydrogen association between the macromolecular chains, including a structural change from double helix-B form to single helix-V form (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010; Assaad et al., 2011) with an increased hydrophobicity. By complexation, native starch-omega3 showed a slight decrease in crystallinity probably due to the inclusion of omega3 in the native starch structure. Differently, the CMS-omega3 complex presented a higher crystallinity when compared to CMS, suggesting a more organized structure and a stabilization of the complex due to the incorporation of omega3 in the CMS helix cavity. No significant differences were observed between CMS-omega3 and CMS-omega3/G patterns (Figure 5.1.3) indicating that omega3 plays the prominent role in the crystalline organization of the complex and not the gelatin.

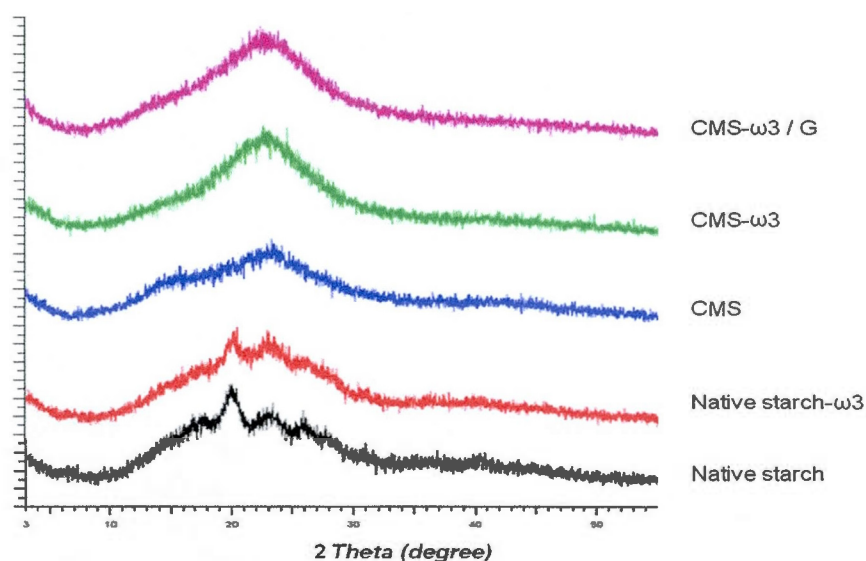


Figure 5.1.3: X-ray diffraction of powders of native starch (Hylon VII), of CMS and of native starch-omega3, CMS-omega3 and CMS-omega3/G complexes.

3.5 Dissolution assay

The omega3 oils commercially formulated in soft gel capsules are naturally insoluble in aqueous fluids. When introduced in SGF the capsules remained at the surface of SGF and despite the fact that they floated for several hours a certain release of omega3 was observed within 2 h. In contrast, the dissolution assay from CMS-omega3/G tablets showed no relevant release of omega3 in SGF (2 h) still remaining at the surface of simulated gastric fluid. This was in part due to the presence of important quantities of omega3 loaded by the monolithic matrix, which confer a hydrophobic character to the tablet and thus limiting its hydration and the release of omega3. On the other hand, the CMS matrix, due to the protonation of carboxylate to carboxylic groups (-COOH) in gastric acidity,

may stabilize the tablet and prevent the omega3 release in the SGF (protonation being responsible for the compact form of tablet). In SIF, a gradual release of omega3 with a complete liberation after 10 h was observed (Figure 5.1.4). This sustained release in SIF (neutral pH) is mainly controlled by the access of intestinal fluid within the CMS tablets and deprotonation of carboxylic acid in more soluble carboxylate ($-\text{COO}^-$) groups. This dissolution profile fits well the needs for a better absorption and improved efficiency of our CMS-omega3/G formulations.

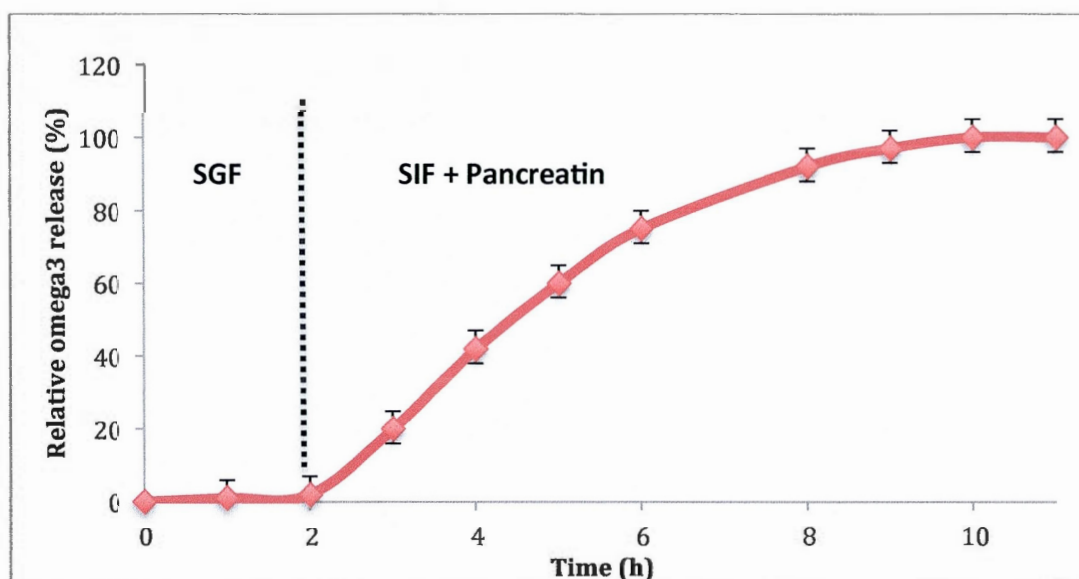


Figure 5.1.4: Release kinetics of omega3 from CMS-omega3/G monolithic tablets in SGF pH 1.2 (2h) and then in SIF in presence of pancreatin (pH 6.8, at 37°C and 100 rpm; the values are the mean of n=3 assays).

3.6 Susceptibility to enzymatic hydrolysis by α -amylase

Although a slightly higher resistance to amylase attack was observed for CMS and CMS-omega3 (due to starch carboxymethylation), the differences were minor (Figure 5.1.5). However these limited but significant differences in enzymatic degradation of native and modified starch (with or without omega3) after 4 h in SIF are relevant, suggesting that intestinal alpha-amylase can render more efficient the release of omega3 bioactive agent from the CMS monolithic tablets. A short lag period can be related to the time required for alpha-amylase to be adsorbed on the external layers of the pills and to progressively diffuse within the matrix to exert its amylolytic activity on the monolithic tablets.

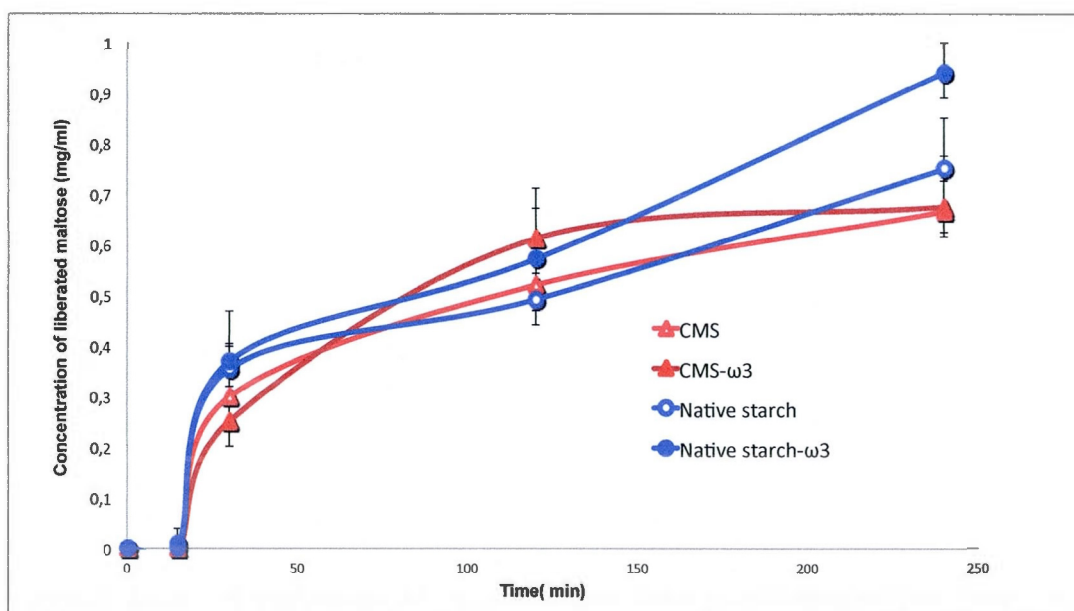


Figure 5.1.5: Susceptibility of tablets based on native starch and of CMS derivative with and without omega3 at hydrolysis with alpha-amylase in SIF at 37°C (the values represent the mean of n=3 assays).

3.7 Light stability and antioxidant capacities of omega3/CMS/G (powder and monolithic tablets)

The relative antioxidant capacity of omega3 complexed by starch and by CMS as powder and tablets was compared to that of liquid omega3 oil extracted from commercial soft-gel capsules after similar exposure to UV (Figure 5.1.6). The omega3 oil from commercial capsules showed a loss of about 90 % of its antioxidant capacity after only 15 min exposure to an UV source, whereas for the omega3 complexed as powder (CMS-omega3/G) the loss of antioxidant capacity was less than 30 % after 1 h UV exposure. Comparison of antioxidant capacities after exposure to UV for 5 h showed that commercial omega3 gel capsules presented a remaining 25 % scavenging capacity whereas our monolithic tablets of CMS-omega3/G presented more than 35 % capacity, showing a more effective stability and antioxidant protection.

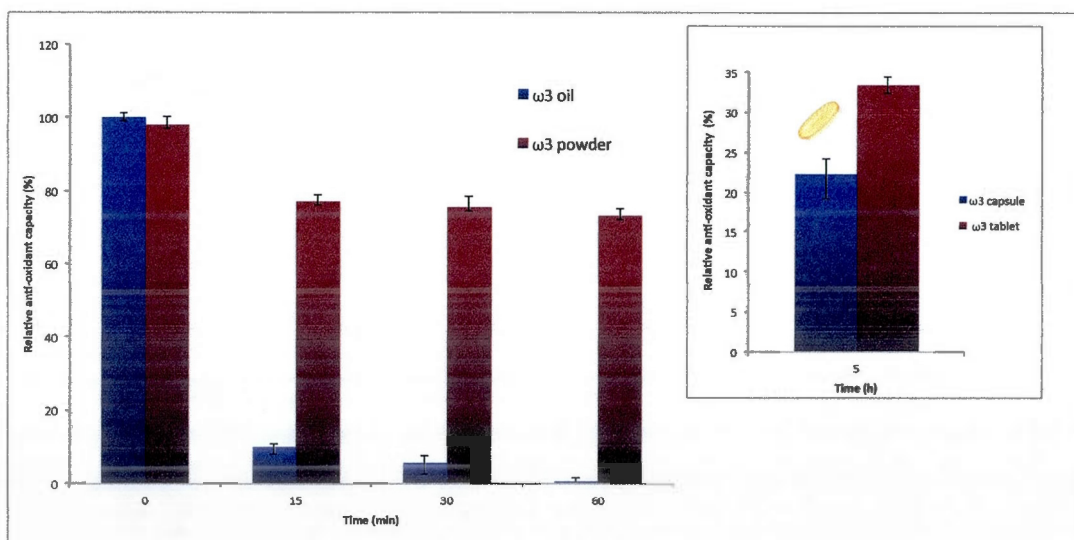


Figure 5.1.6: Stability expressed as remained antioxidant capacity of commercial omega3 oil liquid and of CMS-omega3/G powder (A) and formulated (B) as gel capsules or monolithic tablets CMS-omega3/G, after different times of UV exposure.

3.8 Hypothetical structure of CMS-omega3/G complex

The iodine test revealed that omega3 oils including di- and triglyceride forms were mostly incorporated into the single helix V-form of CMS (Fig 5.1.1). Furthermore, the FT-IR spectrum revealed that there is stabilization by ionic interactions between carboxylate groups of CMS and amino groups of gelatin (Fig 5.1.2). The X-ray diffraction analysis showed that omega3 can play an important role in enhancing the order degree for the CMS matrix (Fig 5.1.3). Based on these premises a hypothetical structure of CMS-omega3/G complex was proposed and presented in Figure 5.1.7. It is supposed that mono-, di-, triglycerides can be included in the V-type helix structure contributing to a kind of internal hydrophobic self-assembling. It is also hypothesized that gelatin can act as a supramolecular assembler of CMS-omega3 by ionic interactions stabilizing thus the whole template of CMS-omega3/G complex.

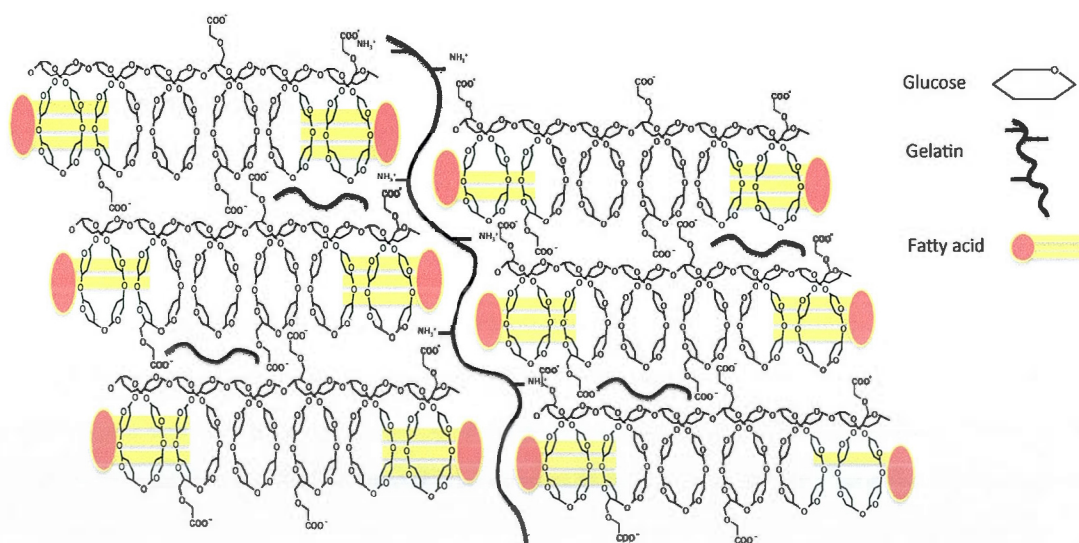


Figure 5.1.7: Hypothetical structure of CMS-omega3/G complex.

The new formulation here proposed seems able to deliver omega3 at the intestinal absorption site and to afford protection against light and undesired oxidation. To the best of our to knowledge this is the first study using modified starch to generate solid complexes with omega3 (mono-, di, triglyceride). This novel type complex presents characteristics that render the omega3 powder useful for different applications as food supplement and ingredient in food processing or as excipient for the formulation of lipophilic compounds susceptible to oxidation like vitamins, antibiotics, antiviral and antitumoral agents.

4. Conclusion

With a higher light stability, better antioxidant capacities and lesser fish off-flavor, these novel omega3 forms can present, as powder forms, interesting applications. As monolithic tablets, these CMS-omega3/G complexes present an improved availability by reducing the duration of gastric residence and floatability, favoring intestinal delivery and increasing the overall users compliance. In addition to the use as food supplement or for various treatments the CMS:omega3 powder can present interesting applications as excipient for formulation of various active principles such as lipophilic agents and light sensitive and susceptible to oxidative damages.

Acknowledgments

Support from NSERC (National Science and Engineering Research Council) of Canada (Discovery Grant) is gratefully acknowledged. Thanks are due for Dr. Pompilia Ispas-Szabo to helpful discussions.

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les rôles importants exercés par les acides gras oméga-3 et l'absence de leurs synthèses par l'organisme, rendent nécessaire leurs apports par l'alimentation ou par supplémentation (Horrocks et Yeo, 1999; Ruxton et al., 2005). Les suppléments d'omega3 commercialisés sous forme de gélules sont généralement stables dans le milieu gastrique, ce qui est dû à l'enrobage entérique (*i.e.* Eudragit®). Cependant, ces gélules présentent deux majeurs inconvénients:

- une faible biodisponibilité due probablement à la longue durée de résidence (phénomène de flottaison) dans l'estomac;
- la libération des huiles omega3 qui peuvent rester principalement à la surface du fluide gastrique en continuant à flotter, même après une vidange gastrique.

Dans ce contexte, nous avons proposé une formulation basée sur la complexation des omega3 sous forme solide, en utilisant le carboxyméthyl amidon (CMA) comme matrice. Le choix de cette matrice a été retenu après avoir comparé expérimentalement différentes matrices (amidon, acétyl-amidon et CMA). La capacité d'inclusion des omega3 (mono-, di- et triglycérides) par

l'amidon était de l'ordre de 1:1 (p/p). Le même comportement a été observé lors de la complexation avec l'acétyl-amidon (moins polaire). En revanche, l'amidon carboxyméthylé (chargé négativement) présentait un niveau encore plus intéressant d'inclusion des omega3 (supérieur à ~100% de son poids initial), ceci étant probablement dû à la structure de l'amylose de forme V (CMA) qui présente une cavité centrale plus large et avec une meilleure capacité hydrophobe à l'intérieur de l'hélice par rapport à la forme A ou B (amidon). Le même phénomène a été observé par Friciu et collab (2013) lors de la complexation du CMA avec la lécithine (un diglycéride).

Aucun phénomène de séparation de phase n'a été observé après inclusion des omega3 dans le CMA. Ce comportement pourrait être attribué à une stabilisation réciproque entre le CMA et les omega3 dont les parties hydrophobes se logent à l'intérieur de la cavité hélicoïdale et les têtes polaires restent à l'extérieur. Le test d'iode a permis de mettre en évidence cette inclusion (Fig 5.1.1). Le CMA, évalué par ce test, présente une coloration spécifique bleu-violette. Cependant, avec la solution contenant le complexe CMA-omega3, la coloration était absente. Probablement que l'incorporation des chaînes aliphatiques des omega3 à l'intérieur de la cavité hélicoïdale du CMA, empêche la formation du complexe d'inclusion coloré iode/CMA.

Bien que le CMA semble convenir à l'inclusion des omega3, ce complexe présente une faible résistance à la compression (perte de l'omega3 des cavités hélicoïdales). Par conséquent, une nouvelle approche a été utilisée afin de stabiliser le complexe CMA-omega3. Il est bien connu que l'addition des protéines (Djordjevic et al., 2004; Sun et Gunasekara, 2009; Duan et al., 2011) ou des agents émulsifiants (Katsuda et al., 2008) pourrait améliorer la stabilité des omega3. La gélatine (G) de type B a été sélectionnée, car cette molécule neutre et polaire est peu coûteuse, autorisée par la FDA et compatible avec les AG. La

gélatine de type B avec un point isoélectrique de 7.5 présente des résidus d'acides aminés majoritairement chargés positivement (lysine, arginine et histidine) qui peuvent interagir avec les groupements carboxylates du CMA et de cette façon stabiliser la structure du complexe. En effet, l'introduction de la gélatine semble améliorer la stabilité du complexe CMA-omega3/G et prévient l'expulsion des omega3 durant la compression allant jusqu'à 1.0 T/cm² (force de compression recommandée et utilisée dans les industries pharmaceutiques).

Les analyses FT-IR du complexe CMA-omega3/G révèlent un épaulement à 1550 cm⁻¹ qui pourrait être attribué aux interactions ioniques survenues entre les groupes -COO⁻ et les groupements amines de la gélatine. Des essais de séchage par « spray- drying » du complexe de G-omega3 ont montré une fusion de la gélatine à 50°C. L'introduction de la gélatine à une concentration de 0.5% dans le complexe CMA-omega3 a permis d'obtenir une poudre résistante à des températures allant jusqu'à 150°C sans aucun phénomène de fusion.

Les analyses par diffractions des rayons-X (DRX) du complexe CMA-omega3/G ont montré un degré d'ordre semblable au CMA-omega3, suggérant que la gélatine ne modifie pas la structure cristalline du complexe d'inclusion CMA-omega3, ce qui pourrait également expliquer la stabilité du complexe.

L'étude du profil de dissolution des comprimés à base de CMA-omega3/G a montré une libération très limitée des omega3 dans le milieu gastrique (2h), probablement due à la protonation des groupements carboxylates du CMA et la formation d'une couche hydrogel qui stabilise les comprimés et empêche la libération de l'huile omega3 dans le fluide gastrique. Ensuite, avec le transit gastro-intestinal, une déprotonation des groupements -COOH dans le milieu intestinal (pH 6.8, site d'absorption) permet la libération lente et graduelle des omega3. D'autre part la dégradation de la matrice CMA des complexes CMA-

omega3 par l'enzyme alpha-amylase a montré érosion (hydrolyse) lente de la matrice du CMA, due probablement à la substitution (0.18 mEq/g) du CMA contribuant ainsi à une libération soutenue des omega3.

Due à l'oxydation rapide des huiles omega3 à la lumière et à l'air, des tests de stabilité (sensibilité aux UV) ont été conduits afin d'évaluer la capacité de protection des omega3 inclus dans le complexe CMA-omega3/G. Le principe consiste à exposer les échantillons à une source UV à différents temps et puis à déterminer la capacité anti-oxydante retenue. Aucune capacité anti-oxydante retenue pour des omega3 libres commerciales (sans protection des capsules) n'a été détectée (0%) après une heure d'exposition aux UV, tandis que celles des omega3 sous forme de poudre (complexes avec CMA) étaient de l'ordre de 70 %, pour la même durée d'exposition. Similairement, des études comparatives entre les formes de comprimés monolithiques et de capsules commerciales ont été effectuées durant 5 heures d'exposition aux UV. Les résultats ont montré que la capacité de protection avec notre formulation à base de CMA-omega3/G sous forme de comprimés (35 %) est supérieure à celle générée par la forme commerciale de type capsules (25 %).

Basé sur les tests effectués, une structure hypothétique du complexe CMS-omega3/G a été proposée (Fig 5.1.7). Ainsi, le test d'iode a permis de révéler l'incorporation des acides gras de forme di- et triglycérides dans la structure simple hélice de forme V du CMA (Fig 5.1.1). Les analyses FT-IR ont également révélé l'existence d'une stabilisation entre les groupements carboxyliques du CMA et les groupes amines de la gélatine par des interactions ioniques (Fig 5.2.1). Enfin, les analyses DRX ont montré que les omega3 semblent stabiliser la structure du CMA (Fig 5.1.3). Il est, alors, supposé que les acides gras mono-, di- et triglycérides puissent s'incorporer dans la cavité hydrophobique de l'hélice V

du CMA et que la gélatine joue le rôle d'assembleur de la structure entière du CMS-omega3/G grace aux interactions ioniques.

En conclusion, durant ce projet de maîtrise a été mise en évidence pour la première fois, l'inclusion des triglycérides avec du carboxyméthyl amidon. L'incorporation des omega3 dans le CMA avec la gélatine a permis d'obtenir un complexe CMA-omega3/G plus stable. Ce nouveau complexe CMA-omega3/G sous forme solide présente plusieurs avantages comparativement aux capsules à base de gélatine, comme suit:

- i) La méthode de production des comprimés est simple et peu couteuse; aucune transformation des oméga-3 (*e.g.* trans-estérification) n'est nécessaire;
- ii) Le complexe CMA-omega3/G sous forme de poudre peut être directement ajouté aux produits alimentaires ou conditionné sous forme de comprimés obtenus par compression directe pour l'utilisation comme suppléments.
- iii) Cette forme permet probablement d'éviter les troubles gastro-intestinaux ainsi que le syndrome «d'éruption de poisson» (Fetterman et Zdanowicz, 2009);
- iv) Comme le support est à base de CMA, le comprimé est mécaniquement stable dans le milieu gastrique et capable de protéger l'agent bioactif empêchant ainsi la libération des omega3 au niveau de l'estomac. Une fois dans le milieu intestinal neutre ou légèrement alcalin, le CMA devient plus soluble et permet la libération des omega3 dans l'intestin (fenêtre d'absorption principale).

Par ailleurs, l'utilisation de ce complexe pourrait présenter un grand intérêt dans l'industrie alimentaire (aliments fonctionnels) ou encore dans le domaine nutraceutique puisque cette forme solide d'omega3 est dispersible dans le

milieu aqueux et aussi dans la majorité des aliments. En plus, ce complexe pourrait être utilisé comme excipient pour la libération ciblée au niveau intestinal de certaines molécules sensibles aux facteurs dénaturants (pH, oxygène, lumière, etc.). Pour ce faire, des études avec différents principes actifs comme des protéines bioactives (insuline, diamino-oxydase, beta-galctosidase, etc.), des petites molécules pharmaceutiques (acide acétylsalicylique, acide ascorbique, pseudoéphédrine) ou encore des produits d'origine naturelle (artémisinine, polyphénols, vitamines) se verraient intéressantes à réaliser. Il serait particulièrement intéressant d'utiliser ce nouveau complexe comme excipient pour formuler avec des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS: ibuprofène, naproxene, diclofenac), car cet excipient pourrait générer des effets bénéfiques (synergiques ou additionnels) dus aux propriétés anti-inflammatoires des omega3.

BIBLIOGRAPHIE

Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aïd, S., Poumès-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G. et Lavialle, M. 2004. «Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life». *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 44, p. 509-538.

Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A. et Rasenick, M. M. 2007. «Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling». *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, p. 128-140.

Anil, E. 2007. «The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: influence of apoE genotype». *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 66, p. 60-68.

Arterburn, L. M., Hall, E. B. et Oken, H. 2006. «Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans». *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 83, p. 1467-1476.

Arvanitoyannis, I. S. 2002. «Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings». *Protein-based films and coatings*, p. 467-484.

Asghar, A., et Henrickson, R. 1982. «Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems». *Adv. Food Res.*, vol. 28, p. 1-372.

Assaad, E., et Mateescu, M. A. 2010. «The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics». *Int. J. Pharm.*, vol. 394, p. 75-84.

Assaad, E., Wang, Y. J., Zhu, X. X. et Mateescu, M. A. 2011. «Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration». *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, p. 1399-1407.

Bang, H., Dyerberg, J. et Nielsen, A. N. 1971. «Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos». *The Lancet*, vol. 297, p. 1143-1146.

Banks, W., et Greenwood, C. 1971. «The conformation of amylose in dilute solution». *Starch - Stärke*, vol. 23, p. 300-314.

Bates, F. L., French, D. et Rundle, R. 1943. «Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation¹». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 65, p. 142-148.

Bazan, N. G. 2006. «The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling». *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 26, p. 901-913.

Bertucco, A., et Vetter, G. 2001. *High Pressure Process Technology: fundamentals and applications: fundamentals and applications*: Access Online via Elsevier p.

Bigi, A., Panzavolta, S. et Rubini, K. 2004. «Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films». *Biomaterials*, vol. 25, p. 5675-5680.

Biliaderis, C. G. 1991. «The structure and interactions of starch with food constituents». *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, p. 60-78.

Buléon, A., Colonna, P. et Leloup, V. 1990. «Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales». *Industries alimentaires et agricoles*, vol. 107, p. 515-532.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. et Ball, S. 1998. «Starch granules: structure and biosynthesis». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 23, p. 85-112.

Burr, G. O., et Burr, M. M. 1929. «A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet». *J. Biol. Chem.*, vol. 82, p. 345-367.

Burr, M., Gilbert, J., Holliday, R. A., Elwood, P., Fehily, A., Rogers, S., Sweetnam, P. et Deadman, N. 1989. «Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)». *The Lancet*, vol. 334, p. 757-761.

Calinescu, C., et Mateescu, M. A. 2008. «Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, p. 582-589.

Calinescu, C., Mondovi, B., Federico, R., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. 2012. «Carboxymethyl starch: chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery». *Int. J. Pharm.*, vol. 428, p. 48-56.

- Calinescu, C., Mulhbachter, J., Nadeau, É., Fairbrother, J. M. et Mateescu, M. A. 2005. «Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 53-60.
- Calinescu, C., Nadeau, É., Mulhbachter, J., Fairbrother, J. M. et Mateescu, M.-A. 2007. «Carboxymethyl high amylose starch for F4- fimbriae gastro-resistant oral formulation». *Int. J. Pharm.*, vol. 343, p. 18-25.
- Carstensen, J., et Rhodes, C. 1993. «Pellicule formation in gelatin capsules». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 19, p. 2709-2712.
- Cartilier, L., Mateescu, M. A., Dumoulin, Y. et Lenaerts, V. (1997). «Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets». International patent PCT/CA94/00 163.
- Chafetz, L., Hong, W. H., Tsilifonis, D. C., Taylor, A. K. et Philip, J. 1984. «Decrease in the rate of capsule dissolution due to formaldehyde from polysorbate 80 autoxidation». *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, p. 1186-1188.
- Chen, I. S., Subramaniam, S., Cassidy, M. M., Sheppard, A. J. et Vahouny, G. V. 1985. «Intestinal absorption and lipoprotein transport of (omega3) eicosapentaenoic acid». *J. Nutr.*, vol. 115, p. 219-225.
- Choi, S. S., et Regenstein, J. 2000. «Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin». *J. Food Sci.*, vol. 65, p. 194-199.
- Clark, A. H., et Ross-Murphy, S. B. 1987. «Structural and mechanical properties of biopolymer gels». In *Biopolymers*, vol. 83, p. 57-192.
- Crawford, M. A. 2006. «Docosahexaenoic acid in neural signaling systems». *Nutr. Health*, vol. 18, p. 263-276.
- Davidson, M. H. 2006. «Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega3 fatty acids». *Am. J. Cardiol.*, vol. 98, p. 27-33.
- Dickinson, E., et Lopez, G. 2001. «Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial milk proteins». *J. Food Sci.*, vol. 66, p. 118-123.
- Din, J.N., Newby, D. E., Flapan A.D. 2004. «Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease- fishing for a natural treatment». *Bmj*, vol. 5, p. 328-330

Djabourov, M., Lechaire, J. et Gaill, F. 1992. «Structure and rheology of gelatin and collagen gels». *Biorheology*, vol. 30, p. 191-205.

Djordjevic, D., McClements, D. et Decker, E. 2004. «Oxidative Stability of Whey Protein - stabilized Oil - in - water Emulsions at pH 3: Potential ω - 3 Fatty Acid Delivery Systems (Part B)». *J. Food Sci.*, vol. 69, p. C356-C362.

Donovan, J. W. 1979. «Phase transitions of the starch-water system». *Biopolymers*, vol. 18, p. 263-275.

Duan, J., Jiang, Y. et Zhao, Y. 2011. «Chitosan-Whey Protein Isolate Composite Films for Encapsulation and Stabilization of Fish Oil Containing Ultra Pure Omega - 3 Fatty Acids». *J. Food Sci.*, vol. 76, p. C133-C141.

Dumoulin, Y., Clement, P., Mateescu, M. et Cartilier, L. 1994. «Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in compressed tablets». *S.T.P. Pharm Sciences*, vol. 4, p. 329-335.

Duprat, F., Gallant, D., Guilbot, A., Mercier, C., Robin, J. et Gauthier, B. 1980. «L'amidon». *Les polymères végétaux*. Paris: Gauthier-Villars, p. 176-231.

Edouard Bourre, J.-M., et Marc Paquotte, P. 2007. «Contributions (in 2005) of marine and fresh water products (finfish and shellfish, seafood, wild and farmed) to the French dietary intakes of vitamins D and B12, selenium, iodine and docosahexaenoic acid: impact on public health». *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, p. 491-501.

Exarhopoulos, S., et Raphaelides, S. N. 2012. «Morphological and structural studies of thermally treated starch-fatty acid systems». *J. Cereal Sci.*, vol. 55, p. 139-152.

Feller, S. E. 2008. «Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids». *Chem. Phys. Lipids*, vol. 153, p. 76-80.

Fetterman Jr, J. W., et Zdanowicz, M. M. 2009. «Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease». *Am. J. Health Syst. Pharm.*, vol. 66, p. 1169-1179.

Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Kriem, B., Olivier, J.-L., Pillot, T. et Oster, T. 2007. «Towards a nutritional approach for prevention of

Alzheimer's disease: biochemical and cellular aspects». *J. Neurol. Sci.*, vol. 262, p. 27-36.

Friciu, M. M., Canh Le, T., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. 2013. «Carboxymethyl starch and lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*

Fuhrhop, J. H., et Mathieu, J. 1984. «Routes to functional vesicle membranes without proteins». *Angew. Chem. Int. Edit*, vol. 23, p. 100-113.

Gallant, D. J., Bouchet, B. et Baldwin, P. M. 1997. «Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization». *Carbohydr. Polym.*, vol. 32, p. 177-191.

Garg, M., Wood, L., Singh, H. et Moughan, P. 2006. «Means of Delivering Recommended Levels of Long Chain n - 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Diets». *J. Food Sci.*, vol. 71, p. 66-71.

Gebauer, S. K., Psota, T. L., Harris, W. S. et Kris-Etherton, P. M. 2006. «n- 3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits». *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 83, p. 1526-1535.

Gérard, C., Planchot, V., Colonna, P. et Bertoft, E. 2000. «Relationship between branching density and crystalline structure of A-and B-type maize mutant starches». *Carbohydr. Res.*, vol. 326, p. 130-144.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. et Mulligan, C. N. 1999. «Encapsulation in the food industry: a review». *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, p. 213-224.

Godet, M., Tran, V., Delage, M. et Buléon, A. 1993. «Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 15, p. 11-16.

Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M., Alemán, A. et Montero, P. 2009a. «Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts». *Food. Chem.*, vol. 112, p. 18-25.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Alemán, A. et Gómez-Guillén, M. 2009b. «Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts». *Food Hydrocolloids*, vol. 23, p. 1334-1341.

- Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B. et Montero, P. 2009. «Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films». *Trends. Food. Sci. Tech.*, vol. 20, p. 3-16.
- Gómez-Guillén, M., Turnay, J., Fernández-Díaz, M., Ulmo, N., Lizarbe, M. et Montero, P. 2002. «Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study». *Food Hydrocolloids*, vol. 16, p. 25-34.
- Gómez - Guillén, M. C., Sarabia, A. I., Solas, M. T. et Montero, P. 2001. «Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin gelatin». *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, p. 665-673.
- Guesnet, P., Alessandri, J.-M., Astorg, P., Pifferi, F. et Lavialle, M. 2005. «Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI)». *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, vol. 12, p. 333-343.
- Hardy, J., et Selkoe, D. J. 2002. «The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics». *Science*, vol. 297, p. 353-356.
- Harris, W. S., et Bulchandani, D. 2006. «Why do omega3 fatty acids lower serum triglycerides?». *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 17, p. 387-393.
- He, P., Davis, S. S., et Illum, L. 1998. «*In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres». *Int.J. Pharm.*, vol. 166, p. 75-88.
- Henriksen, I., Green, K. L., et Smart, J. D. 1996. «Bioadhesion of hydrated chitosans: An *in vitro* study». *Int. J. Pharm.*, vol. 145, p. 231-240.
- Horrocks, L. A., et Yeo, Y. K. 1999. «Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA)». *Pharmacol. Res.*, vol. 40, p. 211-225.
- Hsein-Chih, H. W., et Sarko, A. 1978. «The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose». *Carbohydr. Res.*, vol. 61, p. 7-25.
- Hsien-Chih, H. W., et Sarko, A. 1978. «The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose». *Carbohydr. Res.*, vol. 61, p. 27-40.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A. et Tran, V. 1988. «The double-helical nature of the crystalline part of A-starch». *J. Mol. Biol.*, vol. 201, p. 365-378.

- Imberty, A., et Perez, S. 1988. «A revisit to the three - dimensional structure of B - type starch». *Biopolymers*, vol. 27, p. 1205-1221.
- Immel, S., et Lichtenthaler, F. W. 2000. «The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex». *Starch - Stärke*, vol. 52, p. 1-8.
- Innis, S. M. 2008. «Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain». *Brain Res.*, vol. 1237, p. 35-43.
- Ispas-Szabo, P., Ravenelle, F., Hassan, I., Preda, M. et Mateescu, M. A. 1999. «Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release». *Carbohydr. Res.*, vol. 323, p. 163-175.
- Jacobs, H., et Delcour, J. A. 1998. «Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review». *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, p. 2895-2905.
- Jin, Y., Perrie, C., Zhang, W., Diepen, C., Curtis, J. et Barrow, C. J. 2007. «Microencapsulation of marine lipids as a vehicle for functional food delivery». *Marine nutraceuticals and functional foods*, p. 115-155.
- Johnston-Banks, F. 1990. «Gelatine». In *Food gels* (Ed. P. Harris), Elsevier, London, p. 233-289.
- Jung, J., et Perrut, M. 2001. «Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey». *J. of Supercritical Fluids.*, vol. 20, p. 179-219.
- Karim, A., et Bhat, R. 2008. «Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects». *Trends. Food. Sci. Tech.*, vol. 19, p. 644-656.
- Krayukhina, M. A., Samoilova, N. A. et Yamskov, I. A. 2008. «Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications». *Russian Chem. Rev.*, vol. 77, p. 799-813.
- Katsuda, M. S., McClements, D., Miglioranza, L. H. et Decker, E. A. 2008. «Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with β -lactoglobulin and pectin». *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, p. 5926-5931.

Kawai, K., Takato, S., Sasaki, T. et Kajiwara, K. 2012. «Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures». *Food Hydrocolloids*, vol. 27, p. 228-234.

Kim, H.-Y., Bigelow, J. et Kevala, J. H. 2004. «Substrate preference in phosphatidylserine biosynthesis for docosahexaenoic acid containing species». *Biochemistry*, vol. 43, p. 1030-1036.

Layé, S. 2010. «Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being». *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 82, p. 295-303.

Lazik, W., Heinze, T., Pfeiffer, K., Albrecht, G. et Mischnick, P. 2002. «Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, p. 743-752.

Le Bail, P., Bizot, H., Ollivon, M., Keller, G., Bourgaux, C. et Buléon, A. 1999. «Monitoring the crystallization of amylose-lipid complexes during maize starch melting by synchrotron x - ray diffraction». *Biopolymers*, vol. 50, p. 99-110.

Legrand, P. 2003. «Données récentes sur les désaturases chez l'animal et l'homme». *Cahiers de nutrition et de diététique*, vol. 38, p. 376-383.

Lemieux, M., Gosselin, P. et Mateescu, M. A. 2009. «Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: Mechanistic study and the influence of degree of substitution». *Int. J. Pharm.*, vol. 382, p. 172-182.

Lemieux, M et Mateescu, M.A.. 2010. «Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch». *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, p. 775-785.

Lenaerts, V., Dumoulin, Y. et Mateescu, M. A. 1991. «Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets». *J. Control. Release*, vol. 15, p. 39-46.

Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S. et Osako, K. 2009. «Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin». *Food Hydrocolloids*, vol. 23, p. 1993-2000.

Liu, H., Arntfield, S. D., Holley, R. A. et Aime, D. B. 1997. «Amylose-lipid complex formation in acetylated pea starch-lipid systems». *Cereal. Chem.*, vol. 74, p. 159-162.

- Lukiw, W. J., et Bazan, N. G. 2008. «Docosahexaenoic acid and the aging brain». *J. Nutr.*, vol. 138, p. 2510-2514.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. et Desobry, S. 2006. «Flavour encapsulation and controlled release—a review». *Int. J. Food. Sci. Tech.*, vol. 41, p. 1-21.
- Malumba, P., Janas, S., Deroanne, C., Masimango, T. et Béra, F. 2011. «Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 15.
- Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M. G., Geraci, E., Levantesi, G. et Maggioni, A. P. 2002. «Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione». *Circulation*, vol. 105, p. 1897-1903.
- Martin, A. 2001. «The apports nutritionnels conseillés (ANC)for the French population». *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 41, p. 119-128.
- Massicotte, L. P., Baille, W. E. et Mateescu, M. A. 2008. «Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients: Structural insights and formulation of pancreatic enzymes». *Int. J. Pharm.*, vol. 356, p. 212-223.
- Mateescu, M., Lenaerts, V. et Dumoulin, Y. 1991. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». Canadian Patent 2,041,774
- Mchugh, T. H., Aujard, J. F. et Krochta, J. 1994. «Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties». *J. Food Sci.*, vol. 59, p. 416-419.
- Meyer, M. C., Straughn, A. B., Mhatre, R. M., Hussain, A., Shah, V. P., Bottom, C. B., Cole, E. T., Lesko, L. L., Mallinowski, H. et Williams, R. L. 2000. «The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules». *Pharm. Res.*, vol. 17, p. 962-966.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D. et Ring, S. G. 1985. «The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch». *Carbohydr. Res.*, vol. 135, p. 271-281.

- Mogelson, S., Pieper, S. J. et Lange, L. G. 1984. «Thermodynamic bases for fatty acid ethyl ester synthase: catalyzed esterification of free fatty acid with ethanol and accumulation of fatty acid ethyl esters». *Biochemistry*, vol. 23, p. 4082-4087.
- Morrison, W., Law, R. et Snape, C. 1993. «Evidence for inclusion complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oat starches». *J. Cereal Sci.*, vol. 18, p. 107-109.
- Murugesan, R., et Orsat, V. 2012. «Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review». *Food and Bioprocess Technology*, vol. 5, p. 3-14.
- Mwangi, J., et Ofner Iii, C. 1995. «Modulation and evaluation of the degree of crosslinking in gelatin hydrogel matrices using a water soluble carbodiimide». *Pharm. Res.*, vol. 12.
- Nagao, K., et Yanagita, T. 2008. «Bioactive lipids in metabolic syndrome». *Prog. Lipid Res.*, vol. 47, p. 127-146.
- Nagawa, Y., et Regen, S. L. 1991. «Membrane-disrupting surfactants that are highly selective toward lipid bilayers of varying cholesterol content». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, p. 7237-7240.
- Nakashima, N., Asakuma, S. et Kunitake, T. 1985. «Optical microscopic study of helical superstructures of chiral bilayer membranes». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, p. 509-510.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. et Bugarski, B. 2011. «An overview of encapsulation technologies for food applications». *Procedia. Food. Sci.*, vol. 1, p. 1806-1815.
- Néel, J., et Champetier, G. 1965. *Exposés de chimie macromoléculaire: structure chimique des polyosides*: Gauthier-Villars, Paris.
- Niemoller, T. D., et Bazan, N. G. 2010. «Docosahexaenoic acid neurolipidomics». *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 91, p. 85-89.
- Niu, S.-L., Mitchell, D. C., Lim, S.-Y., Wen, Z.-M., Kim, H.-Y., Salem, N. et Litman, B. J. 2004. «Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency». *J. Biol. Chem.*, vol. 279, p. 31098-31104.

O'Sullivan, A. C., et Perez, S. 1999. «The relationship between internal chain length of amylopectin and crystallinity in starch». *Biopolymers*, vol. 50, p. 381-390.

Oates, C. G. 1997. «Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis». *Trends. Food Sci. Technol.*, vol. 8, p. 375-382.

Payne, K., et Veis, A. 1988. «Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies». *Biopolymers*, vol. 27, p. 1749-1760.

Pérez, S., et Bertoft, E. 2010. «The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review». *Starch - Stärke*, vol. 62, p. 389-420.

Prata, C., Mora, N., Polidori, A., Lacombe, J.-M. et Pucci, B. 1999. «Synthesis and molecular aggregation of new sugar bola-amphiphiles». *Carbohydr. Res.*, vol. 321, p. 15-23.

Putseys, J., Lamberts, L. et Delcour, J. 2010. «Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties». *J. Cereal Sci.*, vol. 51, p. 238-247.

Rose, P., Mark, H., Bikales, N., Overberger, C., Menges, G. et Kroschwitz, J. 1987. «Encyclopedia of polymer science and engineering». Mark, HF, Bikales, NM, Overberger, CG, Menges, G., Kroschwitz, JI, Eds, p. 488-513.

Ruxton, C., Ruxton, C., Calder, P., Reed, S. et Simpson, M. 2005. «The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health». *Nutr. Res. Rev.*, vol. 18, p. 113-129.

Saghir, M., Werner, J. et Laposata, M. 1997. «Rapid in vivo hydrolysis of fatty acid ethyl esters, toxic nonoxidative ethanol metabolites». *Am. J. Physiol.*, vol. 273, p. G184-G190.

Saiz, L., et Klein, M. L. 2001. «Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations». *Biophys. J.*, vol. 81, p. 204-216.

Saussure, T. 1819. «Observations Sur la Decomposition de L'amidon a la Temperature Atmospherique par L'action de L'air et de L'eau». *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 109, p. 29-58.

Schmitz, G., et Ecker, J. 2008. «The opposing effects of omega- 3 and omega- 6 fatty acids». *Prog. Lipid Res.*, vol. 47, p. 147-155.

Shahidi, F., et Miraliakbari, H. 2004. «Omega3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1-cardiovascular disease and cancer». *J. Med. Food*, vol. 7, p. 387-401.

Shahidi, F., et Miraliakbari, H. 2005. «Omega3 fatty acids in health and disease: part 2-health effects of omega3 fatty acids in autoimmune diseases, mental health, and gene expression». *J. Med. Food*, vol. 8, p. 133-148.

Shaikh, S. R., Dumaul, A. C., Castillo, A., Locascio, D., Siddiqui, R. A., Stillwell, W. et Wassall, S. R. 2004. «Oleic and docosahexaenoic acid differentially phase separate from lipid raft molecules: a comparative NMR, DSC, AFM, and detergent extraction study». *Biophys. J.*, vol. 87, p. 1752-1766.

Silverstein, R. M., Webster, F. et Kiemle, D. 2005. «Spectrometric identification of organic compounds, 7th edition, 82-110. John Wiley & Sons».

Stute, R. 1992. «Hydrothermal Modification of Starches: The Difference between Annealing and Heat/Moisture - Treatment». *Starch - Stärke*, vol. 44, p. 205-214.

Sun, C., et Gunasekaran, S. 2009. «Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum». *Food Hydrocolloids*, vol. 23, p. 165-174.

Tester, R. F., Karkalas, J. et Qi, X. 2004. «Starch—composition, fine structure and architecture». *J. Cereal Sci.*, vol. 39, p. 151-165.

Tharanathan, R. N. et F. S. Kittur. 2003. «Chitin-the undisrupted biomolecule of great potential». *Critical Review's in Food Science and Nutrition*, vol. 43, p. 61 -87.

Thomazine, M., Carvalho, R. A. et Sobral, P. J. 2005. «Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol». *J. Food Sci.*, vol. 70, p. E172-E176.

Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M. A. et Lacroix, M. 2001. «Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes». *J. Food Sci.*, vol. 66, p. 512-516.

Townsend, A. A., et Nakai, S. 1983. «Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins». *J. Food Sci.*, vol. 48, p. 588-594.

Van Nieuwenhuyzen, W., et Tomás, M. C. 2008. «Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies». *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, vol. 110, p. 472-486.

Vliegenthart, J., Kragten, E., Leeftang, B. et Kamerling, J. 1992. «¹H-NMR spectroscopy of O-carboxymethyl derivatives of D-glucose». *Carbohydr. Res.*, vol. 228, p. 433-437.

Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. et Stanton, C. 2010. «Fatty acids from fish: the anti - inflammatory potential of long - chain omega - 3 fatty acids». *Nutr. Rev.*, vol. 68, p. 280-289.

Wallace, J. M., McCabe, A. J., Robson, P. J., Keogh, M. K., Murray, C. A., Kelly, P. M., Marquez-Ruiz, G., McGlynn, H., Gilmore, W. S. et Strain, J. J. 2000. «Bioavailability of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in foods enriched with microencapsulated fish oil». *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 44, p. 157-162.

Wang, Y., Assaad, E., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M. et Zhu, X. 2011. «NMR imaging of chitosan and carboxymethyl starch tablets: Swelling and hydration of the polyelectrolyte complex». *Int. J. Pharm.*, vol. 419, p. 215-221.

Wang, Y., Wang, Y., Yang, J., Pfeffer, R., Dave, R. et Michniak, B. 2006. «The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery». *Powder technology*, vol. 164, p. 94-102.

Wang, Y.-J., Truong, V.-D. et Wang, L. 2003. «Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis». *Carbohydr. Polym.*, vol. 52, p. 327-333.

Whistler, R., et Daniel, J. 1984. «Molecular structure of starch». *Starch: Chemistry and technology*, p. 153-182.

Wurzburg, O. B. 1986. *Modified starches-properties and uses*: CRC Press Inc. p.

Yang, L., Kuksis, A. et Myher, J. 1990a. «Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination». *J. Lipid Res.*, vol. 31, p. 137-147.

Yang, L.-Y., Kuksis, A. et Myher, J. 1990b. «Intestinal absorption of menhaden and rapeseed oils and their fatty acid methyl and ethyl esters in the rat». *Biochem. Cell Biol.*, vol. 68, p. 480-491.

Yannas, I. 1972. «Collagen and gelatin in the solid state». *Journal of Macromolecular Science—Reviews in Macromolecular Chemistry*, vol. 7, p. 49-106.

Yannas, I., et Tobolsky, A. 1967. «Cross-linking of gelatine by dehydration».

Yep, Y. L., Li, D., Mann, N. J., Bode, O. et Sinclair, A. J. 2002. «Bread enriched with microencapsulated tuna oil increases plasma docosahexaenoic acid and total omega3 fatty acids in humans». *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, vol. 11, p. 285-291.

Young, A. H. 1984. «Fractionation of starch». *Starch: Chemistry and technology*, vol. 2, p. 249-283.

Zobel, H. 1988. «Molecules to granules: a comprehensive starch review». *Starch - Stärke*, vol. 40, p. 44-50.

Zobel, H., Young, S. et Rocca, L. 1988. «Starch gelatinization: An X-ray diffraction study». *Cereal Chem*, vol. 65, p. 443-446.

Žoldáková, A., Sroková, I., Sasinková, V., Hirsch, J. et Ebringerová, A. 2005. «Biosurfactants based on partially esterified O-(carboxymethyl) starch». *Chemical Papers*, vol. 59, p. 362-367.

Zuidam, N. J., et Heinrich, E. 2010. «Encapsulation of aroma». In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, p. 127-160: Springer.